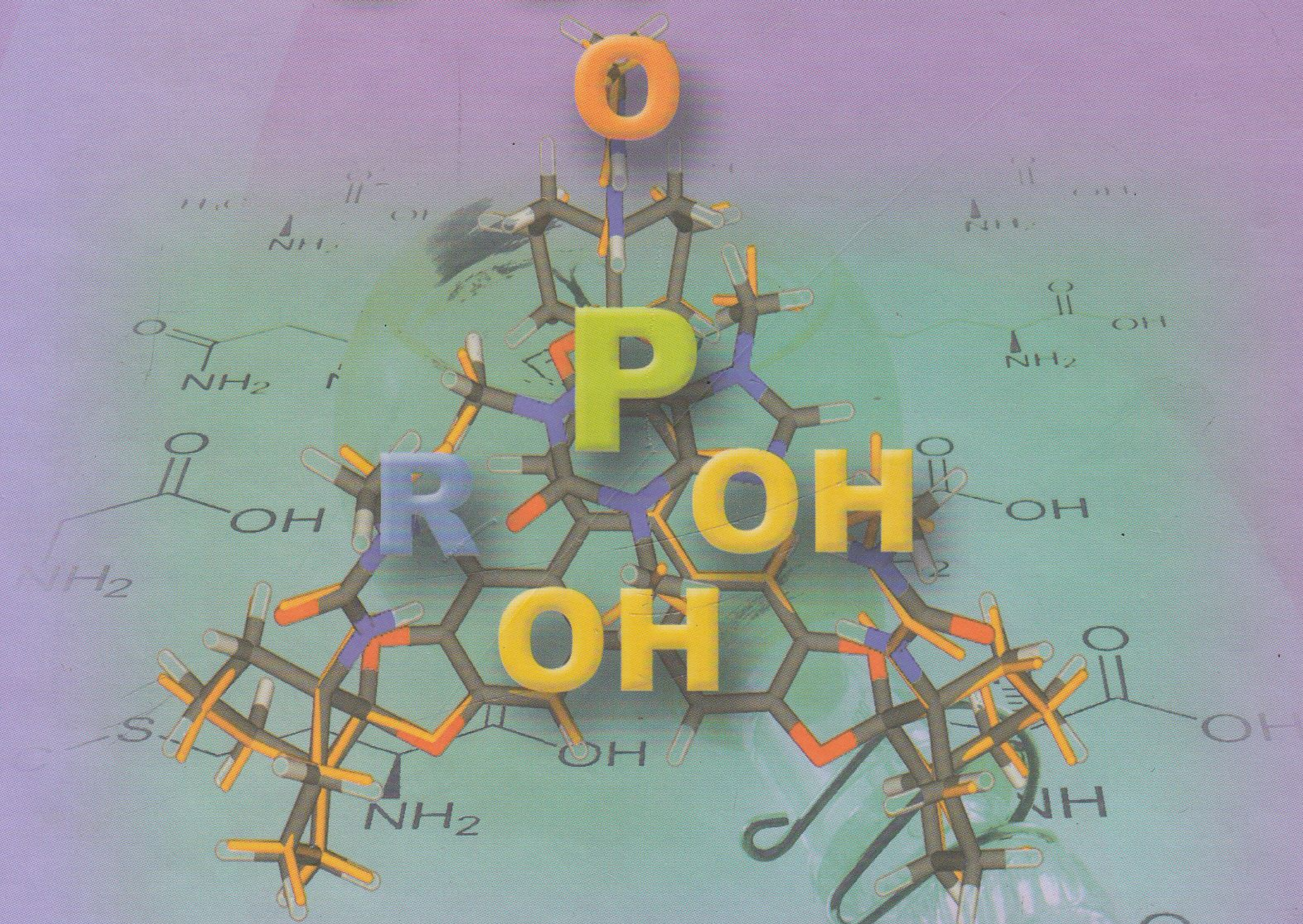
الكيمياء الحياتية التطبيقية



أ.د. دلاور محمد صابر
جامعة صلاح الدين
كلية العلوم

أ.د. ميسون بشير رسام
جامعة صلاح الدين
كلية العلوم

تقديم : أ.د. محمد سليمان مبارك
الجامعة الأردنية
كلية العلوم



www.dardjlah.com

الكيمياء
الحياتية التطبيقية

الكيمياء
الحياتية التطبيقية

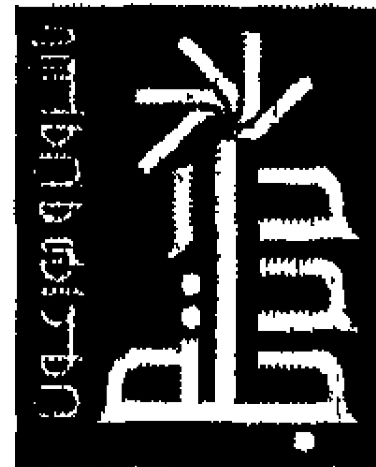
تأليف

أ.د دلاور محمد صابر   أ.د ميسون بشير رسام

أ.د محمد سليمان مبارك

الطبعة الأولى

2014



• **الكيمياء الحياتية التطبيقية**

أ.د دلاور محمد صابر أ.د ميسون بشير رسام أ.دمحمد سليمان مبارك

الطبعة الأولى 2014

منشورات:



دار دجلة

ناشرون وموزعون

المملكة الأردنية الهاشمية

عمان- شارع الملك حسين- مجمع الفحيص التجاري

تلفاكس: 0096264647550

خلوي: 00962795265767

ص. ب: 712773 عمان 11171- الأردن

E-mail: dardjlah@ yahoo.com

www.dardjlah.com

❖ رقم الإيداع لدى دائرة المكتبة الوطنية (2013/9/3380)

9957-71-384-3: ISBN

الآراء الموجودة في هذا الكتاب لا تعبر بالضرورة عن رأي الجهة الناشرة

الفهرس

الفصل الأول: الفيتامينات والتميمات الأنزيمية

الفصل الثاني: الأنزيمات

الفصل الثالث: الاختمار Fermentation

الفصل الرابع: الشحوم Lipids

تقديم

يعاني الدارس للعلوم الطبيعية والتطبيقية من نقص واضح في المكتبة العربية يجعله في حيرة من أمره ويدفعه دفعاً إلى الكتب الأجنبية وخاصة الإنجليزية منها. والعودة إلى الكتاب الأجنبي ليس يسيراً على الكثيرين من طلبة الجامعات العربية، مما يزيد الأمر تعقيداً ويبقي قضايا بالعلم مستغلقة على أذهان الدارسين –وعلم الكيمياء بكل تشعباته هو أحد هذه العلوم التي نلاحظ نقصاً في الكتب العربية منها. وإسهاماً في سد هذا النقص، كان هذا الجهد الكبير والطيب الذي قام به كل من الأستاذ الدكتور دلاور محمد صابر، والأستاذة الدكتورة ميسون بشير رسام في إخراج كتابهما "تطبيقات في الكيمياء الحياتية" إلى حيّز الوجود – ذلك الكتاب الذي يعدّ بحق إضافة هامة إلى المكتبة العربية وموجه بشكل أساس إلى الطلبة الدارسين في كليات العلوم والصيدلة والطب والزراعة. وكلي أمل في أن يكون هذا الكتاب عوناً لهؤلاء الطلبة في دراساتهم وأبحاثهم.

يحتوي هذا الكتاب على عدد غير قليل من الفصول، مرتبة حسب التسلسل المنطقي للمواد والموضوعات، ويغطي في مجمله المفاهيم الأساسية والمهمة التي يحتاجها الطالب الجامعي سواء في دراسته الدنيا أو العليا بسهولة ويسر. وقد وضع الكتاب بأسلوب سلس يراعي تجنب التكرار الممل الذي قد يدفع الطالب إلى العزوف عن الموضوع ويساعده على فهم المادة العلمية بطريقة واضحة ومنظمة- وفي اعتقادي بأن هذا الكتاب والجهد الذي بذل فيه يتماشى إيجابياً مع الإتجاه لتدريس العلوم الطبيعية والتطبيقية باللغة العربية، وأكاد أجزم بأنه سيثري المكتبة العربية- وآمل بأن يكون هذا الكتاب بما حوى بين طياته من علم ومعرفة لبنة مفيدة في الصرح العلمي العربي، وأن يجد موقعه الذي

يستحقه في المكتبة العربية ، وأن يجد القبول الحسن لدى الدارسين والباحثين وأن يكون إضافة في مجاله للمكتبة العربية- وأود هنا أن أنوه بالجهد الكبير الذي بذله المؤلفان حتى رأى هذا الكتاب النور.

وأسأل الله أن يجعلنا دائماً ممن يستمع القول فيتبع أحسنه. وأن يوفقنا لخدمة دينه وخدمة المجتمع العربي والمسلم.

د. محمد سليمان مبارك
الجامعة الأردنية
كلية العلوم –قسم الكيمياء
عمان 11942
Email: mmubarak@ju. Edu. jo

المقدمة

انطلاقا منا لتشجيع التأليف و الترجمة ولإغناء المكتبة العربية بالكتب المؤلفة، قمنا بتأليف هذا الكتاب ليخدم طلبتنا الأعزاء والمهتمين بمجال الكيمياء الحياتية التبطيقية.

يحتوي كتاب " الكيمياء الحياتية التطبيقية" فصولاً أربعة أولها: يتناول الفيتامينات والتميمات الأنزيمية ويعنى بتصنيفها وتخليقها وخصائصها ودورها الحيوي وانتشارها وأهميتها في تغذية الإنسان. أما الفصل الثاني: فيختص بالأنزيمات من حيث اكتشافها وخصائصها العامة وتسميتها النظامية وأهميتها في علم الأغذية. كما يتناول هذا الفصل أهم الأنزيمات في علم الأغذية وفي الصناعة من حيث تفاصيل التفاعلات التي تحفزها بما في ذلك آليات التحفيز وحركيات التفاعل. أما الفصل الثالث: فيتناول أنواع الاختمار في الكائنات المجهرية والظروف الملائمة للإنتاج الصناعي لبعض نواتج الاختمار مع توضيح لآليات التفاعلات اينما أمكن ذلك. والفصل الرابع: يخص موضوع الشحوم ومواد الاستحلاب تركيبها وآلية عملها.

لقد دُونت المعلومات في كتابنا هذا بحيث تكون ملائمة لطلبة الدراسات الأولية والعليا، فهناك سرد لمعلومات أساسية، ومن ثم تفصيل دقيق لموضوعات أخرى فإذا أراد القاريء أن يخوض في دقائق الأمور فهناك العديد من التفاعلات قد ذكرت مع آلياتها وخصائصها الحركية.

يمكن أن يفيد هذا الكتاب طلبة قسم الكيمياء في كليات العلوم وطلبة الأحياء المجهرية الصناعية في قسم علوم الحياة إضافة إلى طلبة كليات الزراعة قسم الصناعات الغذائية، والذين يدرسون كيمياء الأغذية والتخمرات.

كما يستفيد من الكتاب خريجو الكليات المذكورة الموجودين في المعامل الصناعية.

وفقنا الله لدفع عجلة العلم إلى الامام

والله ولي التوفيق.

المؤلفان

الفصل الأول

الفيتامينات
والتميمات الانزيمية

الفصل الأول

الفيتامينات والتميمات الأنزيمية

Vitamins and Coenzymes

1-1 المقدمة:

يقصد بالفتيامين، العامل الغذائي الجوهري الذي يحتاجه الكائن الحي بكميات قليلة والذي ينتج عن غيابه أمراض نقص معينة.

إن الفيتامينات جوهرية للكائن الحي لأنه يستطيع تخليقها، وهي ضرورية للحياة. وتختلف الحاجة للفيتامينات باختلاف الكائنات الحية. يوضح الجدول 1.1 الفيتامينات التي يحتاجها الإنسان في غذائه ووظائفها الكيميائية الحياتية.

يحصل الإنسان على الفيتامينات من غذائه، وقد تكون موجودة بشكل سلف الفيتامين provitamin كما هي الحالة مع فيتامين D وA.

يستطيع الجسم أن يحول سلف الفيتامين إلى الفيتامين. تمتلك الفيتامينات خواصا كيميائية لكل منها وتظهر تأثيرات متخصصة في العمليات الحيوية ولهذا ينتج عن نقصها خلل في العمليات الأيضية التي تظهر تأثيراتها فيها مما يؤدي إلى ظهور أعراض مرضية، وكمثال البرى ـ برى الناتج عن نقص فيتامين B_1 والبلاغرا الناتج عن نقص فيتامين B_3 (حامض النكتوتنك) وفقر الدم الناتج عن نقص حامض الفولك والعشو الليلي الناتج عن نقص فيتامين A

يحتاج قسم من الأنزيمات في عملها إلى جزيئات عضوية غير بروتينية تسمى تبعا لطبيعة ارتباطها بالبروتين الأنزيمي فإذا كان ارتباطها وثيقا سميت المجاميع الضميمة (prosthetic groups) وبعكسه تسمى التميمات الأنزيمية (Coenzymes)، تمثل الفيتامينات أو مشتقاتها مجاميع ضميمة أو تميمات

أنزيمية للعديد من الأنزيمات وكمثال يعمل مشتق فيتامين B_3 المسمى (Nicotinamdie adenine dinucleotide) بمثابة تميم أنزيمي للعديد من أنزيمات الأكسدة المرجعة (Oxidoredutases) كما يعمل فيتامين B_6 (Pyridoxal) بصيغة المجموعة الضميمة (Pyridoxal phosphate) مع الأنزيمات الناقلة للمجاميع الأمينية (Transaminases) بنقل المجاميع الأمينية من حامض أميني إلى حامض الفاكيتو. وسوف نتطرق خلال هذا الفصل إلى كيمياء وآلية عمل الفيتامينات المختلفة.

جدول 1-1 الفعالة الكيميائية الحياتية للفيتامينات

الفيتامين	الوظيفة الكيميائية الحياتية
الفتيامينات الذائبة في الدهون	تخليق عديدات السكريد المخاطية
فيتامين A Retinol	والكورتكوستريويدات
الديهايد فيتامين A(Retinin) فيتامين D	ادراك الضوء، وحدة بناء الصباغ البصرية للشبكية Optical Pigments ارتشاف Resorption
	ايونات الكالسيوم من الأمعاء، يسهم في تنظيم أيض الكالسيوم والفسفور وتكلس العظام
فيتامين E(توكوفيرول)	تأثير مضاد للأكسدة. نقل الالكترونات في الدورة التنفسية.
فيتامين K	تخليق البروثرومبين نقل الالكترونات في الدورة التنفسية.
الفيتامينات الذائبة في الماء	
فيتامين B_1 (ثيامين)	بصيغة بيروفوسفات الثيامين، مجموعة ضميمة لأنزيمات إزالة الكربوكسيل من الحوامض الالفا- كيتونية وكمثال الأنزيم pyruvic decarboxylase وللأنزيمات الناقلة من نوع Transketolase
فيتامين B_2	بصيغة الفلافين أحادي النيوكليوتيد FMN وفلافين ادنين

الفيتامين	الوظيفة الكيميائية الحياتية
(ريبوفلافين)	ثنائي النيوكليوتيد FMN، مجموعة ضمينة لأنزيمات الفلافين التي تحفز تفاعلات الأكسدة والاختزال.
فيتامين B_3 (حامض النكوتنك) اونياسين Niacin	بصيغة نكوتناميد ادنين ثنائي النيوكليوتيد +NADP أو بصيغة نكوتناميد ادنين ثنائي النيوكليوتيد المفسفر+NADP، تميم انزيمي لأنزيمات الأكسدة المرجعة Oxidoreductases
فيتامين B_{12}	بصيغة Cobamide تميم انزيمي في تفاعلات إعادة الترتيب الجزيئي Molecular rearrangements
فيتامين C (حامض الاسكوربك) البيوتينBiotin	تفاعلات الهدركسلة Hydroxylation بصيغة Biocytin لنقل مجاميع الكربوكسيل في تفاعلات الكربكسلة carboxylation
حامض الفولك	بصيغة رباعي هيدوحامض الفولك THE تميم انزيمي لنقل ثمالات Residues أحادي الكربون.
حامض البنتوثنك	بصيغة تميم الأنزيم Coenzyme A في تفاعلات نقل مجاميع الاسيل

2-1 : تسمية وتصنيف الفيتامينات

تقسم الفيتامينات عادة نسبة إلى ذوبانها الى مجموعتين:

- الفيتامينات الذائبة في الماء مثل مجموعة فيتامين B وفيتامين C
- الفيتامينات الذائبة في الدهون مثل فيتامين A وD وE وk أن هذا التقسيم اعتباطي ولكنه مفيد نظرا لأن خاصية الذوبان تحدد بعض الخواص التحليلية والحياتية وكمثال وجود الفيتامينات في الأغذية، قدرة الكائن الحي على خزنها، الطرق الممكنة لعزلها، استخلاصها من مصادر طبيعية ومبدأ طرق

فصلها وتعيينها. يوضح الجدول 1-2 تسمية الفيتامينات المعتمدة من قبل الاتحاد العالمي للكيمياء الصرفة والتطبيقية IUPAC والتسمية الشائعة والأسماء القديمة.

1-3 تحليل الفيتامينات

تقسم الطرق المستخدمة للكشف عن الفيتامينات وتعيينها إلى:

جدول 1-2 تسمية الفيتامينات

التسمية المعتمدة من قبل IUPAC	التسمية الشائعة	الأسماء القديمة
رتنول (Ritinol)	فيتامين A	الفيتامين المضاد للخمج (Anti-infection)
اركوكالسفرول (Ergocalciferol)	فيتامين D_2	الفيتامين المضاد للكساح
كولكالسفرول (Cholecalciferol)	فيتامين D_3	(Anti- rachitic)
توكوفيرولات (Tocopherols)	فيتامين E	الفيتامين المضاد للعقم
لا يوجد قرار رسمي	فيتامين K	الفيتامين المضاد للنزف، فيتامين التجلط، عامل البروثرومبين
الثيامين (Thiamine)	فيتامين (B_1)	الفيتامين المضاد لالتهاب

جدول 2-1

الأسماء القديمة	التسمية الشائعة	التسمية المعتمدة من قبل (IUPAC)
العصب (Anti-neuritic) الفيتامين المضاد للبري- بري	انيورين (Aneurin)	
الفيتامين الاصفر فيتامين pp العامل pp	فيتامين (B_2) لاكتوفلافين) نياسين (Niacin) حامض النكوتنك، اميد حامض النكوتنك	الرايبوفلافين (Riboflavin) النيكوتين أميد
فيتامين B_6	بيريدوكسين (pyridoxin)	لا يوجد قرار رسمي
	حامض البنتوثنك	حامض البنتوثنك (pa ntothenic acid)
فيتامين H	بيوتين	بيوتين (Biotin)
	حامض الفولك (Folic) (pteroylglutamic acid) كوبالامين، فيتامين B_{12}	لا يوجد قرار رسمي
الفيتامين المضاد للاسقربوط	فيتامين C	حامض الاسكوربك

أ. الطرق الكيميائية: وتعتمد على تفاعلات متخصصة للطبيعة الكيميائية للفيتامينات.

ب. الطرق الفيزيائية: تعيين بعض الثوابت وكمثال الانطفائية Extinction لقمة طيف الامتصاص.

جـ. الطرق الحياتية: ويمكن التكهن بأن الطرق الكيميائية غالبا ما تتأثر بوجود مواد أخرى مقاربة بالتركيب الكيميائي للفيتامين المراد تعيينه ولكنها لا تمتلك فعالية حياتية. إن استخدام الطرق الكيميائية محدود بطبيعة الحال على الرغم من أن الكروماتوكرافي وكمثال كروماتوكرافي الامتزاز تسمح بإزالة بعض المواد غير المرغوب فيها. أما استخدام الطرق الفيزيائية لتعيين الفيتامينات فإنه يتطلب تنقيتها وكمثال عند قياس الامتصاص الضوئي.

غالبا ما تستخدم اختبارات إضافة المعيار Standard addition للتعيين الكيميائي أو الفيزيائي الكيميائي للفيتامينات حيث تضاف كمية معلومة من الفيتامين إلى النموذج ويجب أن تكون الكمية المضافة مقاربة إلى الكمية الموجودة في النموذج، ثم يتم تعيين الفيتامين في النموذج الرئيسي والنموذج المضاف إليه المعيار مع مراعاة إجراء الاختبار في الوقت ذاته وتحت الظروف نفسها.

إن الطرق الحياتية لتعيين الفيتامينات لا تزال الطرق الأساسية لتعيين طبيعة وكمية الفيتامين ويمكن إجراؤها على الحيوانات بمثابة اختبارات انتقائية prophylactic أو شافية Curative وكمثال بصيغة اختبار النمو، اختبار الكساح Rickets، اختبار الإسقربوط أو اختبار البروثرومبين، ومن مساوئ الطرق الحياتية (تجارب الحيوانات) الزمن الطويل الذي تستهلكه والنسبة العالية للخطأ (30٪) واستهلاك كميات كبيرة من الفيتامينات، ويستخدم حالية على نطاق واسع الاختبارات الحياتية المجهرية وخصوصا لمجموعة فيتامين B إذ تستخدم بعض الأحياء المجهرية مثل البكتيريا أو الخمائر Yeasts والاعفان Moulds التي تحتاج إلى هذه الفيتامينات لنموها وتنشيطها عند إضافة الكمية الملائمة لها. وتتناسب كمية الفيتامين المضافة مع الزيادة في إعداد الخلايا.

إن الطرق الحياتية المجهرية للاختبار أكثر خصوصية من الطرق الفيزيائية الكيميائية وتتطلب وقتا أقصر ومواد أقل.

لقد كانت الوحدات المستخدمة لقياس تركيز الفيتامينات هي الوحدات الدولية (.I.U) وتحدد هذه بالطرق الحياتية (باستخدام الحيوانات) في ظروف معيارية دقيقة، إلا أنه بعد معرفة التراكيب الكيميائية للفيتامينات وإمكانية تحضيرها بصيغة نقية أصبح من الممكن حساب الكمية الحقيقية للفيتامين، الموجودة في الوحدة العالمية.

جدول 1-3: محتوى بعض الفيتامينات في الأغذية، تمثل الأرقام ما موجود في وزن 100 غم من الغذاء القابل للأكل (المصدر 14)

الغذاء	حامض الاسكوربيك mg	نياسين mg	ريبوفلافين mg	ثيامين mg	فيتامينA l.u
اللوز	كميات ضئيلة	3.5	0.92	0.24	0
الجوز	2	.90	.130	.330	30
التفاح	2	.10	.020	.30	40
العرموط (مع القشر)	4	.10	.040	.020	20
المشمش	10	.60	.040	.030	2700
الخوخ	7	.01	.050	.020	1330
الموز	10	.70	.060	.050	190
طحين الحنطة (الاسمر)	صفر	4.3	0.12	0.55	صفر
طحين الحنطة (الأبيض)	صفر	1.0	0.06	0.08	صفر
الرز المطبوخ	صفر	1.0	0.01	0.11	صفر

الغذاء	حامض الاسكوربيك mg	نياسين mg	ريبوفلافين mg	ثيامين mg	فيتامينA I.u
الشعير	صفر	3.1	0.05	0.12	صفر
الفلفل الأخضر	128	0.5	0.08	0.08	420
اللهانة	47	0.3	0.05	0.05	130
القنّبيط (الزهرة)	78	0.7	0.10	0.11	60
الخس	6	0.3	0.06	0.06	330
جوز الهند(ميشور)	3	0.5	0.02	0.05	صفر
البزاليا (جافة)	–	3	0.28	0.74	120
الحمص	–	2.0	0.15	0.31	50
العدس	صفر	0.6	0.06	0.07	20
البيض (كاملا)	صفر				
البيض (البياض)	صفر	0.1	0.27	0	0
البيض (الصفار)	0	0.1	0.29	0.10	1180
التين	2	0.4	0.05	0.06	80
الأناناس	17	0.2	0.03	0.09	70
كريب فروت	38	.20	.020	.040	80
اللانجاص	6	.50	.030	.030	250
العنب	4	.30	.030	.050	100
الطماطا البندورة	23	.70	.040	.060	900
الليمون الحامض	53	.10	.020	.040	20
اللالنكي	31	.10	.020	.060	420
البرتقال	50	.40	.040	.100	200

الغذاء	حامض الاسكوربك mg	نياسين mg	ريبوفلافين mg	ثيامين mg	فيتامين A I.u
البطاطا (مشوية بقشرها)	20	.71	.040	.100	كميات ضئيلة
حليب البقر	1	0.1	0.17	0.03	140
كبد البقر	31	13.6	3.26	0.25	43900
الكلاوي					
غنم	15	7.4	2.42	0.51	690
بقر	15	6.4	2.55	0.36	690
الفطر	3	4.2	0.46	1.10	كميئات ضئيلة
البصل	10	0.2	0.04	0.03	40
البقدونس	7	0.1	0.1	كميات ضئيلة	300
الزبد	صفر	-	-	-	3300

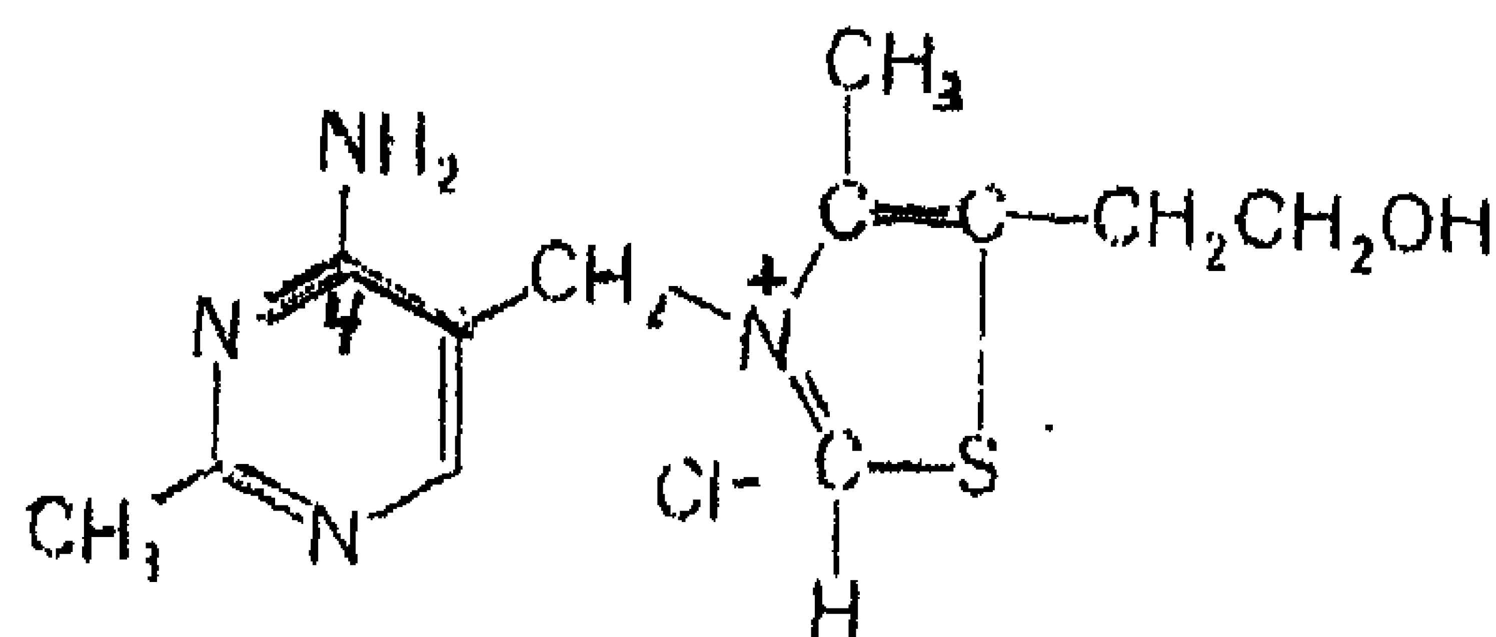
1-4 الفيتامينات الذائبة في الماء

وتضم مجموعة فيتامين B وحامض الإسكوريك (فيتامين C) وحامض الفولك والبيوتين والنكوتين أميد.

1-4 الثيامين (Thiamine)

وهو مشتق لكل من البريمدين والثايزول. ترتبط ذرة الكربون (رقم 4) للبرميدين بمجموعة امين وتلعب حلقة الثايزول دوزا هاما في التفاعلات التي

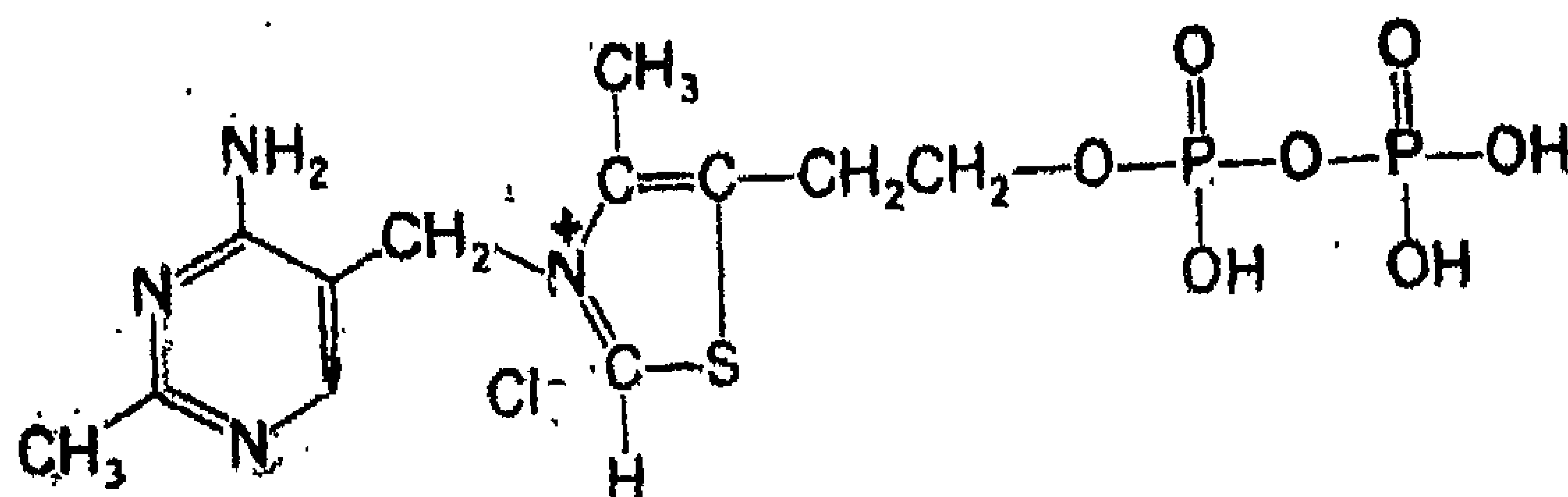
يدخل فيها الثيامين بصيغته الفعالة كما سنوضح ذلك فيما بعد.



Thiamine- HC_1

1-4-1-1 وجوده

الثيامين واسع الانتشار في المملكة الحيوانية والنباتية إذ يوجد في الرز والحبوب والخضروات والبطاطا والخمائر واللحوم والحليب.. الخ، (جدول 1-3) يوجد الفيتامين بصورة حرة أو بشكل ثنائي الفسفات (كما في الخمائر) ويسمى عندئذ بيروفسفات الثيامين (Tpp) (Cocarboxylase) تستطيع النباتات فقط تخليقه بصورة تامة بينما تحتاجه جميع الحيوانات عدا المجترات.



Thiamin pyrophosphate (Tpp)

(cocarboxylase)

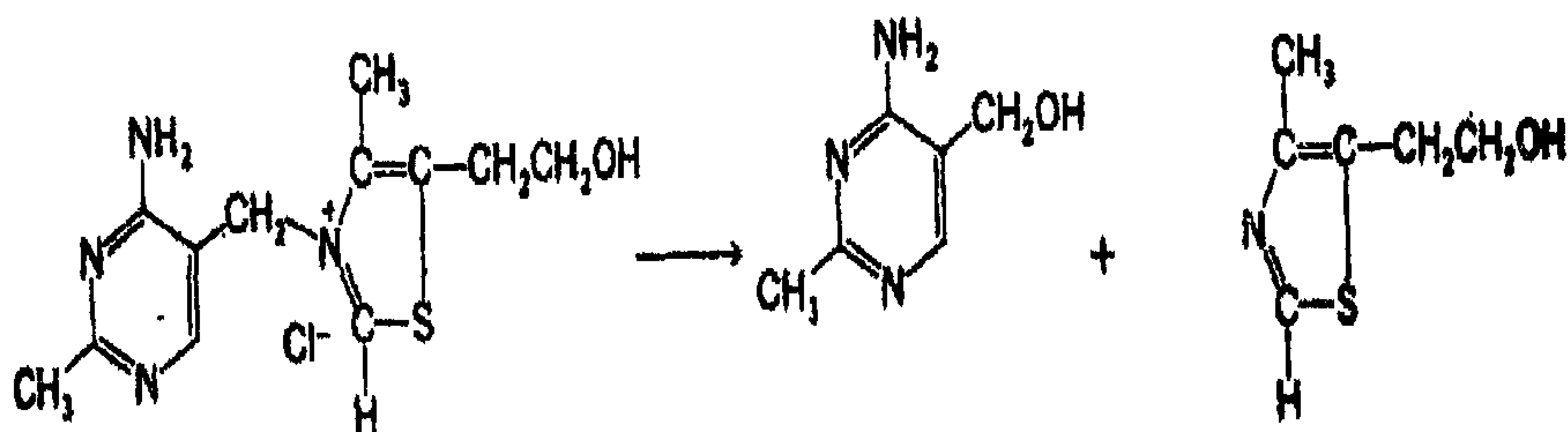
1-4-1-2 الخواص الكيميائية والفيزيائية

يتبلور هدروكلوريد الثيامين بشكل بلورات أحادية الميل Monoclinic عديمة اللون ذات درجة انصهار 250°م، ورائحة مميزة ومذاق مر بعض الشيء.

تكون هذه البلورات ثابتة بوجود الأوكسجين الجوي وهي شديدة الذوبان في الماء وقليلة الذوبان في الكحول وغير ذائبة في الايثر ومذيبات الدهون الأخرى.

يكون هيدروكلوريد الثيامين في الماء محلولا شديد الحامضية ويمتلك المحلول ذو التركيز 5٪ رقم هدروجينيا 03.5 يكون المحلول الحامضي لهدروكلوريد الثيامين ذو الرقم الهيدروجيني الأقل من 5.0 ثابتا نوعا ما تجاه الحرارة والأكسدة ويظهر قمتي امتصاص في المنطقة فوق البنفسجية عند 235 و267 نانوميتر.

يتلف محلول هدروكلوريد الثيامين ذو الرقم الهيدروجيني 5.0 أو أكثر عند تعقيمه بالموصدة Autoclave كما يتلف بالغليان أو حتى بالخزن في درجة حرارة الغرفة إذا كانت PH المحلول 7.0 أو أكثر ويمكن توضيح تأثير المعاملة الحرارية بالمعادلة 1ـ1 والتي توضح كسر جسر المثيلين في الفيتامين وتحويله إلى مشتق الثايزول ومشتق البريميدين.

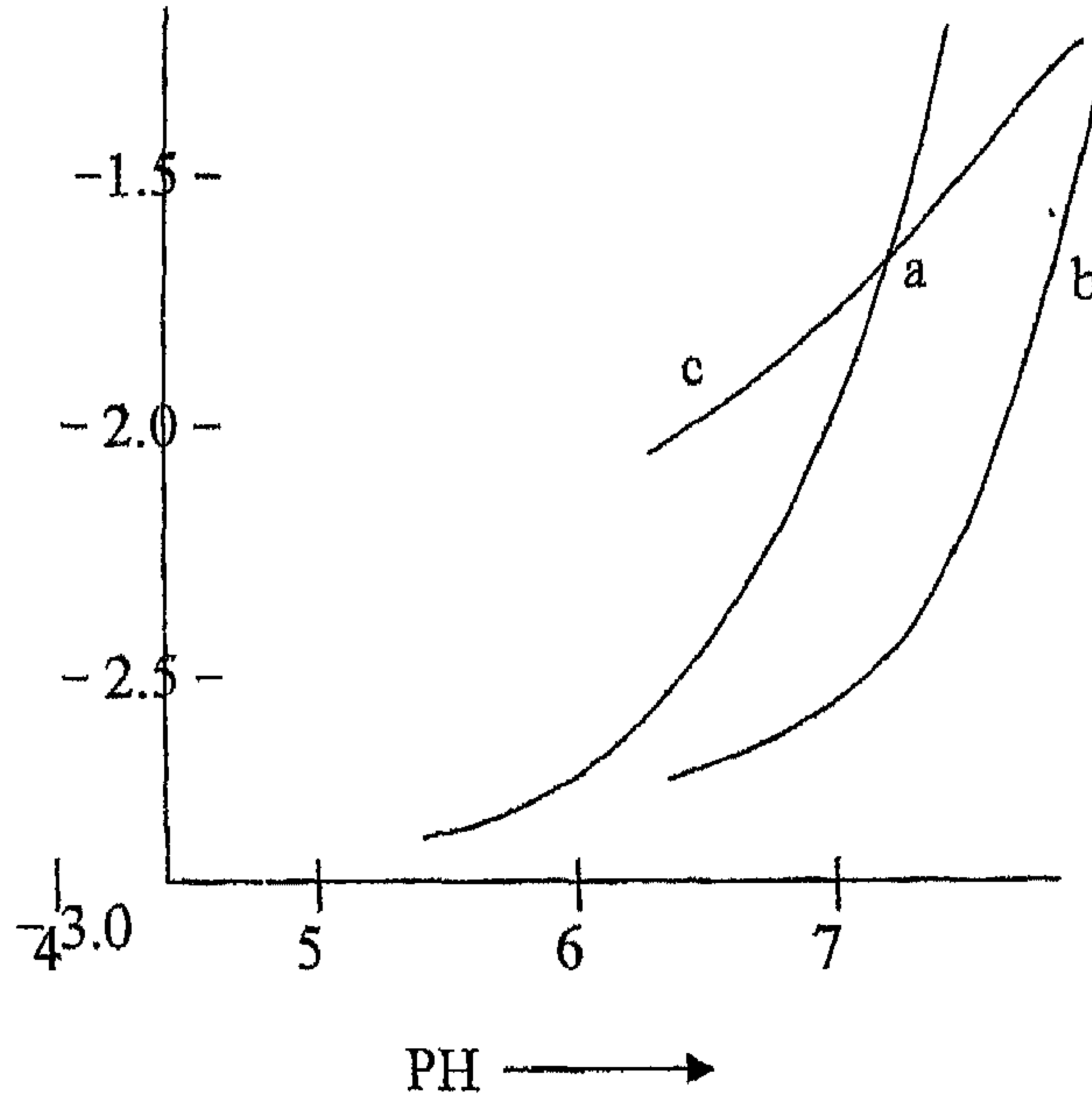


vitamin B_1 مشتق البريميديز مشتق الثايزول

وبصورة عامة تعتمد ثبوتية الثيامين في محلوله على الرقم الهيدروجيني (شكل 1ـ1) والصيغة الجزيئية.

يوضح الشكل 1ـ1 بأن ثابت سرعة فقدان فعالية الثيامين يزداد بازدياد الرقم الهدروجيني سواء تمّت دراسة الثيامين النقي في دراىء الفسفات أو الثيامين

الموجود في طحين القمح أو الشوفان أو بيروفسفات الثيامين الموجود في الطحين كما أن المجاميع المحبة للنواة (المجاميع النيوكليوفيلية) مثل oH و HSO- تؤدي إلى شطر الثيامين إلى جزئي الثايزول والبريميدين وتكوين ثلاثة مركبات كما في المعادلة 1ـ2.



شكل 1 ـ 1 سرعة فقدان فعالية الثيامين في القيم المختلفة للرقم الهيدروجيني

(a) محلول الثيامين في داريء الفسفات.

(b) الثيامين الموجود في طحين القمح أو الشوفان.

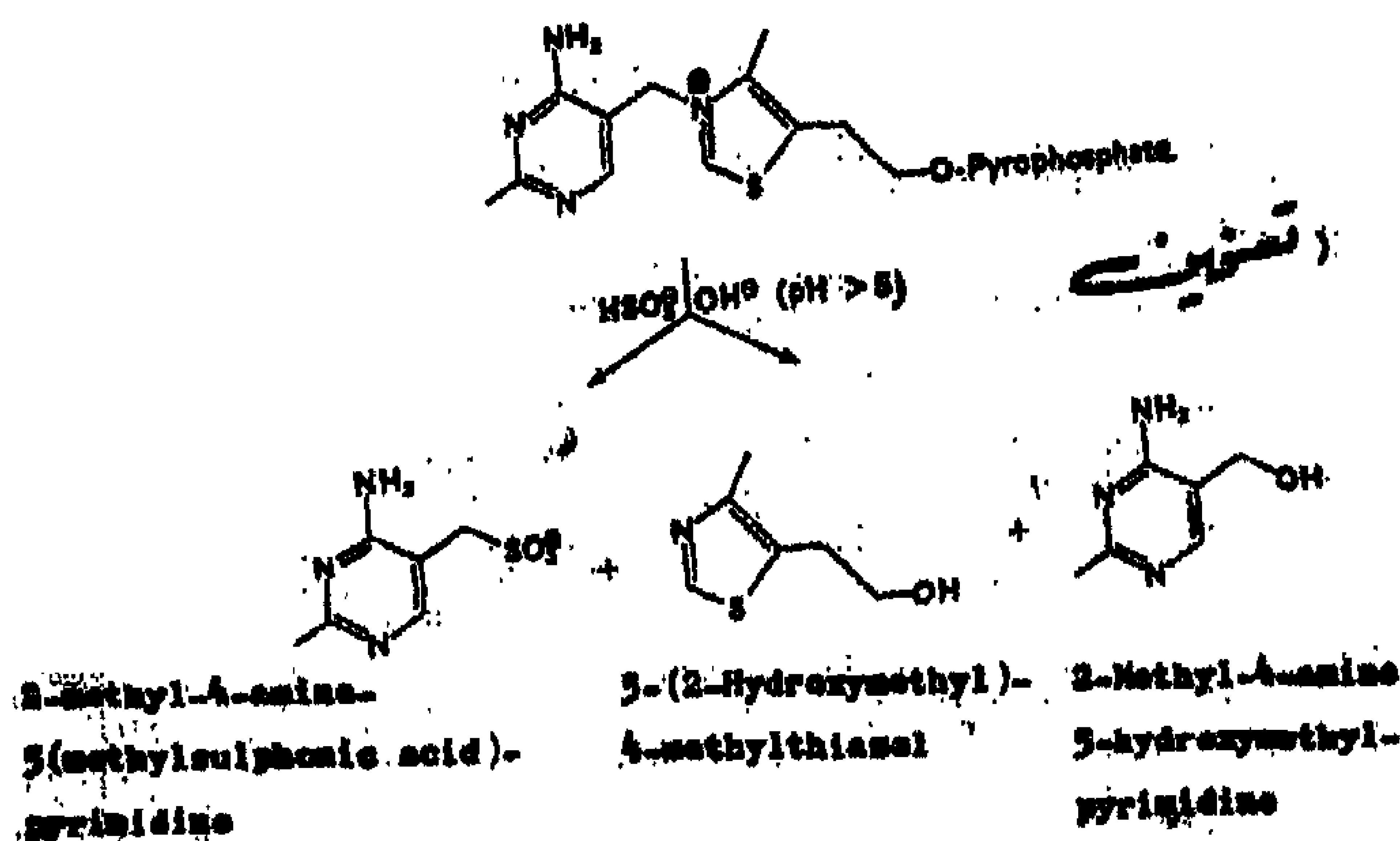
(c) بيروفسفات الثيامين في الطحين.

يؤدي خزن الأغذية إلى فقدان الثيامين وتختلف النسبة المئوية لتلفه باختلاف الأغذية ودرجة حرارة الخزن كما في الجدول (1 ـ4).

جدول 1-4 فقدان الثيامين عند خزن الأغذية لمدة 12 شهر

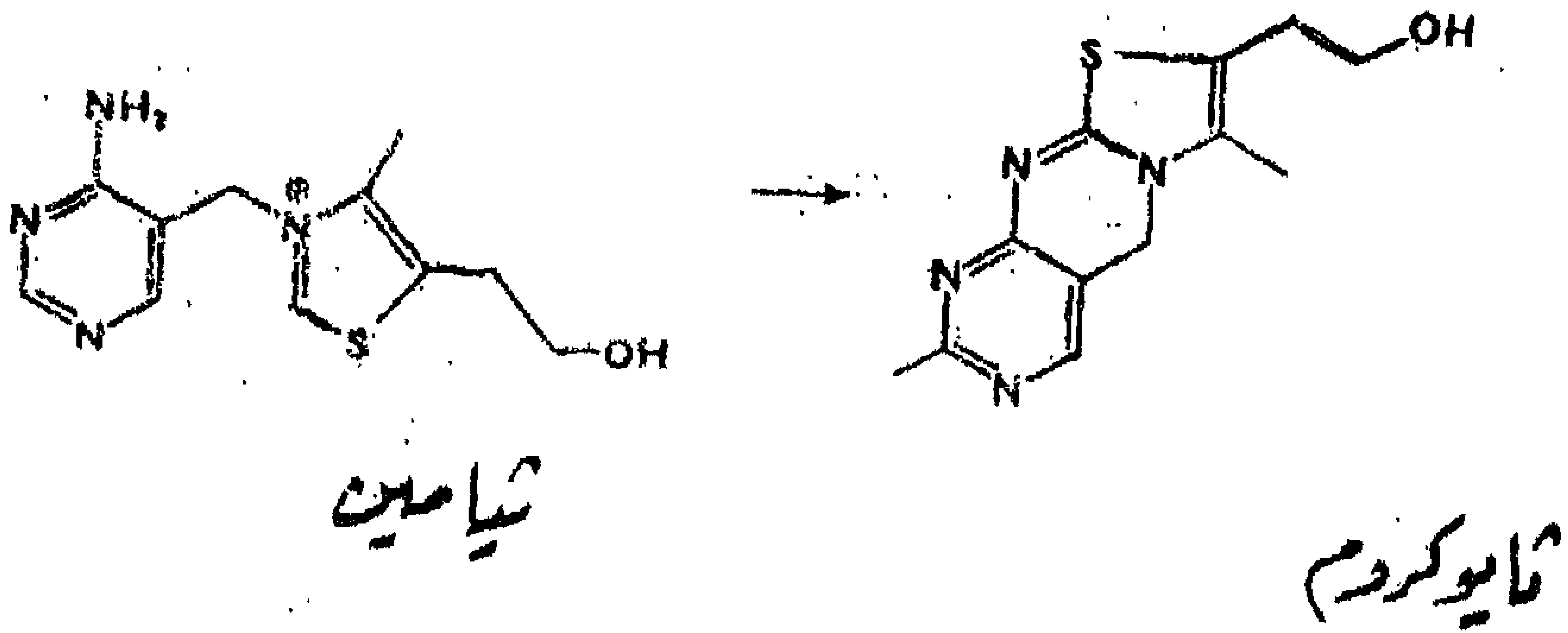
نوع الغذاء	النسبة المئوية لفقدان الثيامين	
	38°م	1.5°م
المشمش	65	28
عصير البرتقال	22	صفر
البازلاء	32	صفر
الباقلاء الخضراء	92	24
عصير الطماطة	40	صفر

المجاميع المحبة للنواة مثل (HSO_3) أو (OH^-) تؤدي إلى هدم الثيامين وتكوين مركبات مختلفة. (انظر المعادلة (1 ـ 2)



يؤكسد الثيامين في محلول شديد القاعدية بواسطة سيانيد الحديديك Ferricyanide إلى الثايوكروم Thiochrome المتألق Fluorescent ويستغل هذا التفاعل لتقدير الفيتامين (انظر المعادلة (1 ـ 3)

تعادل الوحدة العالمية (Iu) للثيامين 3 مايكروغرام منه.



يعمل النتريت على تثبيط الفيتامين ربما نتيجة تفاعله مع مجموعة الامينو في حلقة البريميدين.

1-4-1-3 الثيامين في الأغذية:

تعتمد حاجة الإنسان اليومية للثيامين على مكونات الغذاء. فتزداد بزيادة المواد الكربوهيدراتية وتنخفض بزيادة الدهون. وإذا كانت التغذية متزنة احتاج الإنسان البالغ 1 1.5 ملغم ثيامين.

يكون الثيامين ثابتاً في الطهو الاعتيادي وعند تعليب الخضراوات واللحوم، إما غلي الحليب فإنه يفقده محتواه من الفيتامين وتعتمد الخسارة على فترة الغليان ووجود الهواء بصورة خاصة.

وعلى الرغم من انتشار فيتامين B_1 بصورة واسعة في الطبيعة إلا أن الإنسان لا يتناوله دائماً بكميات كافية حتى في البلدان التي تكون التغذية جيدة فيها والسبب في ذلك لا يمكن في عدم وجود الكميات الكافية من الفيتامين في الغذاء ولكن لتحول الإنسان إلى الأغذيةالحاوية على كميات أقل من الثيامين. ومن الأسباب المختلفة لذلك هي زيادة استهلاك الخبز الأبيض والأغذية المصنوعة

من الطحين الأبيض عوضاً عن استخدام الخبز الأسمر، قلة استهلاك الحبوب وزيادة تناول السكريات إضافة إلى انخفاض حجم الوجبة لانخفاض المجهود العضلي للإنسان. ونظراً لعدم خزن فيتامين B_1 في جسم الإنسان، يمكن أن تؤدي هذه التغيرات في الأغذية إلى شحة الفيتامين.

1-4-1-4 تعيين الثيامين

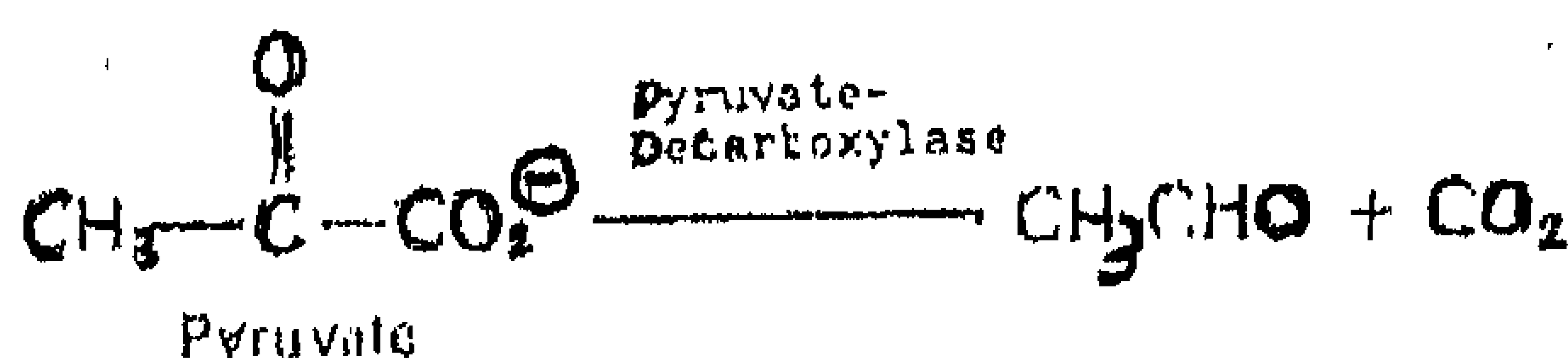
يتم تعيين الثيامين كيميائياً أو بالطرق الفيزيائية الكيميائية وذلك بتعيين تألق الثايوكروم (ناتج أكسدة الثيامين) في المنطقة فوق البنفسجية أو بتفاعلات صبغة الايزوAzo.

ويمكن تعيين فيتامين B_1 كذلك بواسطة الأحياء المجهرية ذلك لأن فيتامين B_1 يعد عامل نمو لها وكمثال استخدام العفن phycomyces.

(اختبار phycomyces= زيادة الوزن الجاف للعفن عند وجود كمية ثابتة من فيتامين B_1) وقد تستخدم كائنات مجهرية أخرى مثل fermentus. Neurospora crassa Lactobacillus إلا أن هذه الطرق تفتقر إلى الخصوصية وتفضل الطرق الكيميائية أو الفيزيائية الكيميائية على استخدام الحيوانات أو الأحياء المجهرية.

1-4-1-5 الفعالية الحياتية:

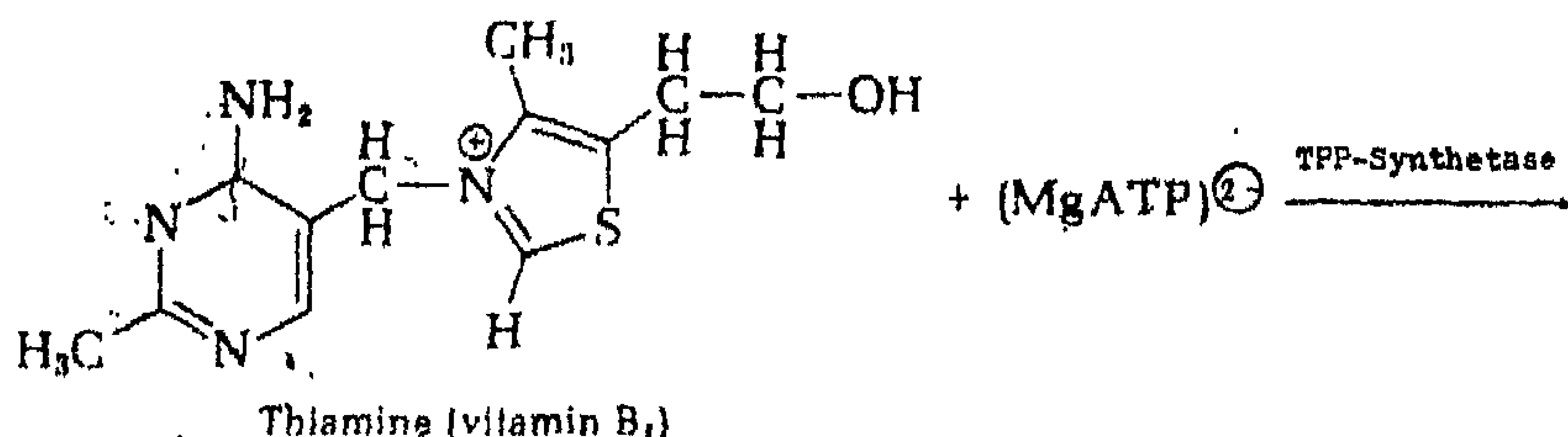
يمثل Tpp التميم الأنزيمي للأنزيمات Transketolase. و pyruvate decarbox- Ylase و Keto acid dehydrogensase- فمثلاً تشتمل عملية التخمر الكحولي في الخمائر على تحويل البيروفات إلى استيالدهيد و CO_2 بوجود الأنزيم pyruvate Mg^{+2} ,Tpp, decarboxylase

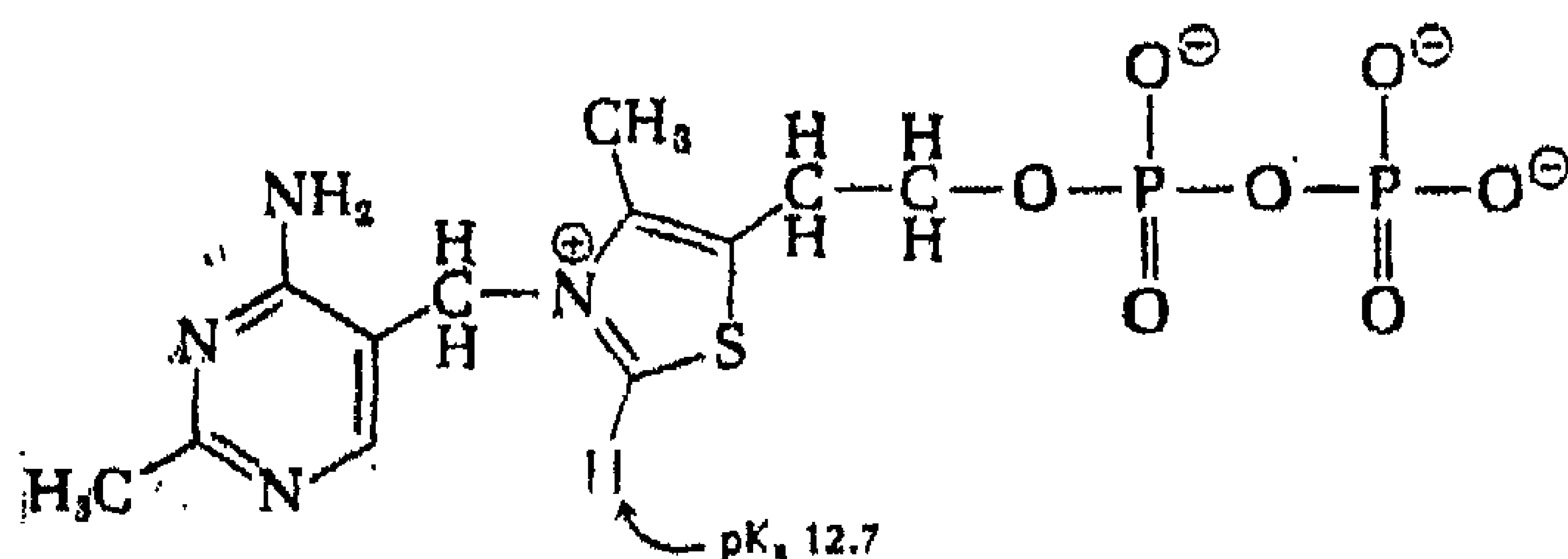


الصيغة الفعالة للثيامين هي بيروفسفات الثيامين (Tpp).

يتكون Tpp من الثيامين والبيروفسفات (الناشئة من الATP).

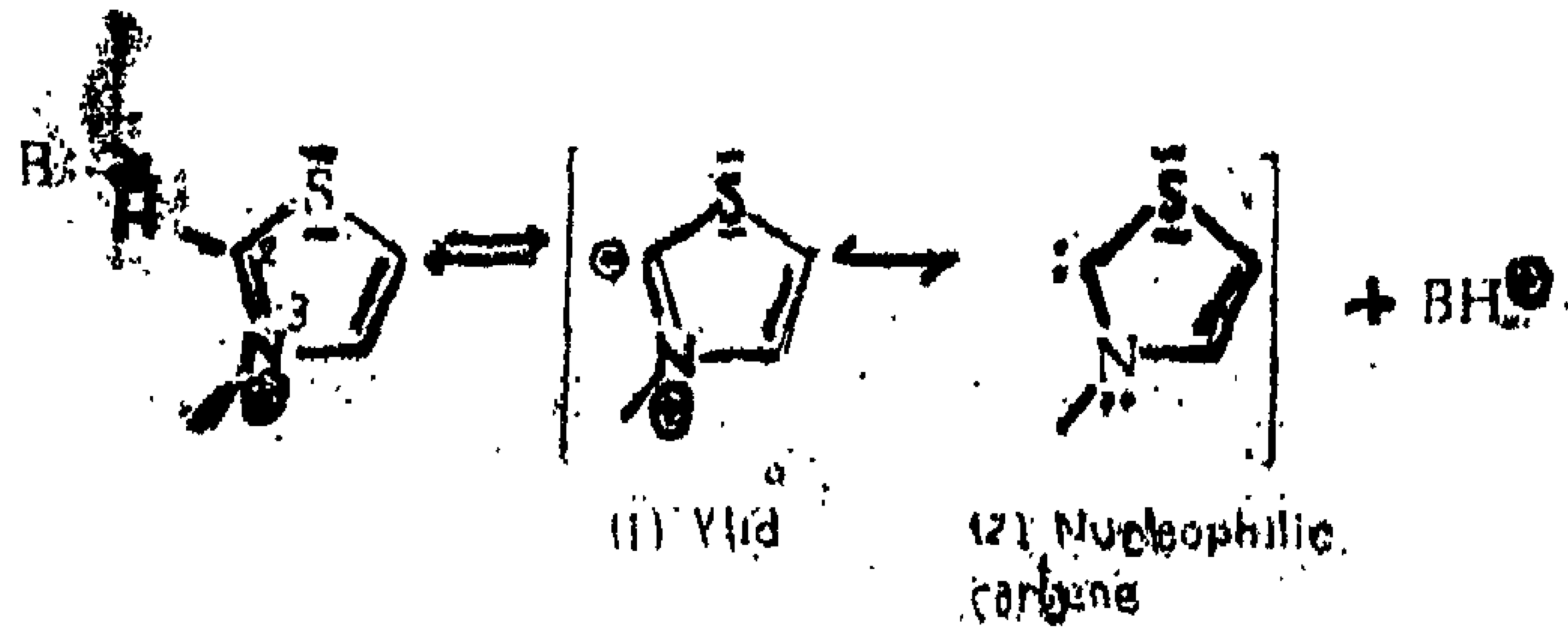
يحفز التفاعل الأنزيم Tpp synthetase





(4–1)

يمكن الاستدلال على خواص التميم الأنزيمي (Tpp) التحفيزية من النتروجين الرباعي لحلقة الثايزول. يمثل هذا النتروجين خوص للالكترونات يعزز حموضة الهدرجين على ذرة الكربون رقم 2 ذات قيمة 12.7=pka. يؤدي إزالة هذا البروتون (المعادلة 1 ـ 5) إلى تكوين الكربأنيون Carbanion الذي يثبت بالنتروجين الرباعي وربما بعدم تموضع Delocalization الزوج الالكتروني للكاربأنيون واشغاله الاوربتالات (d) الخالية لذرة الكبريت المجاورة. يوجد تركيبا رنين للكاربأنيون كما في المعادلة (1 ـ5).

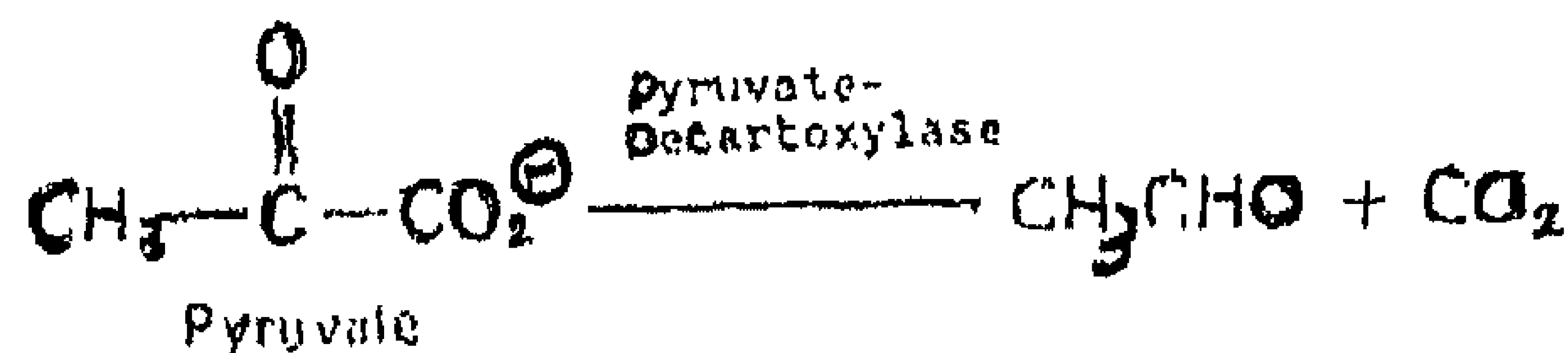


(5 -1)

تشتمل تفاعلات المركب Tpp على تكوين أو شطر آصرة الكربون مجموعة الكربونيل. تسمى تفاعلات الأصرة: تفاعلات التكاثف ــ الفا (α condensations-) كما تسمى تفاعلات شطرة الاصرة الانشطارات الفا (α Cleavages-) تكون هذه التفاعلات تأكسدية أو غير تأكسدية، وتتطلب التفاعلات المؤكسدة FAD أو NAD^+ أو كليهما.

إزالة الكربوسيل غير التأكسدية:

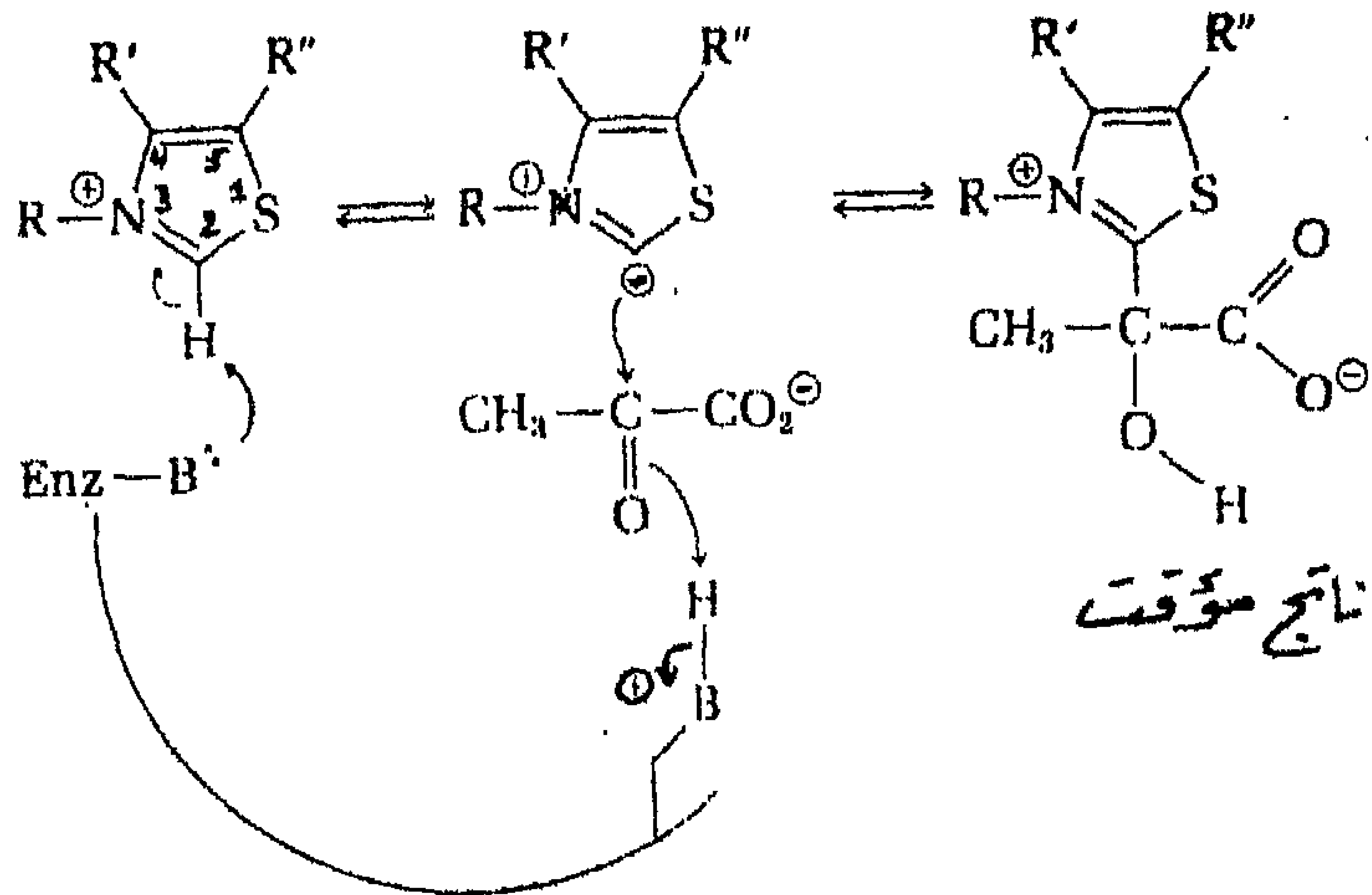
يحول أنزيم الخميرة "مزيل كربوكسيل البيروفات" pyruvate decarboxlase الركيزة Substrate بيروفات pyruvate إلى استالدهيد وثاني أوكسيد الكربون



$$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CO_2^{\ominus} \xrightarrow{\text{Pyruvate-Decarboxylase}} CH_3CHO + CO_2$$

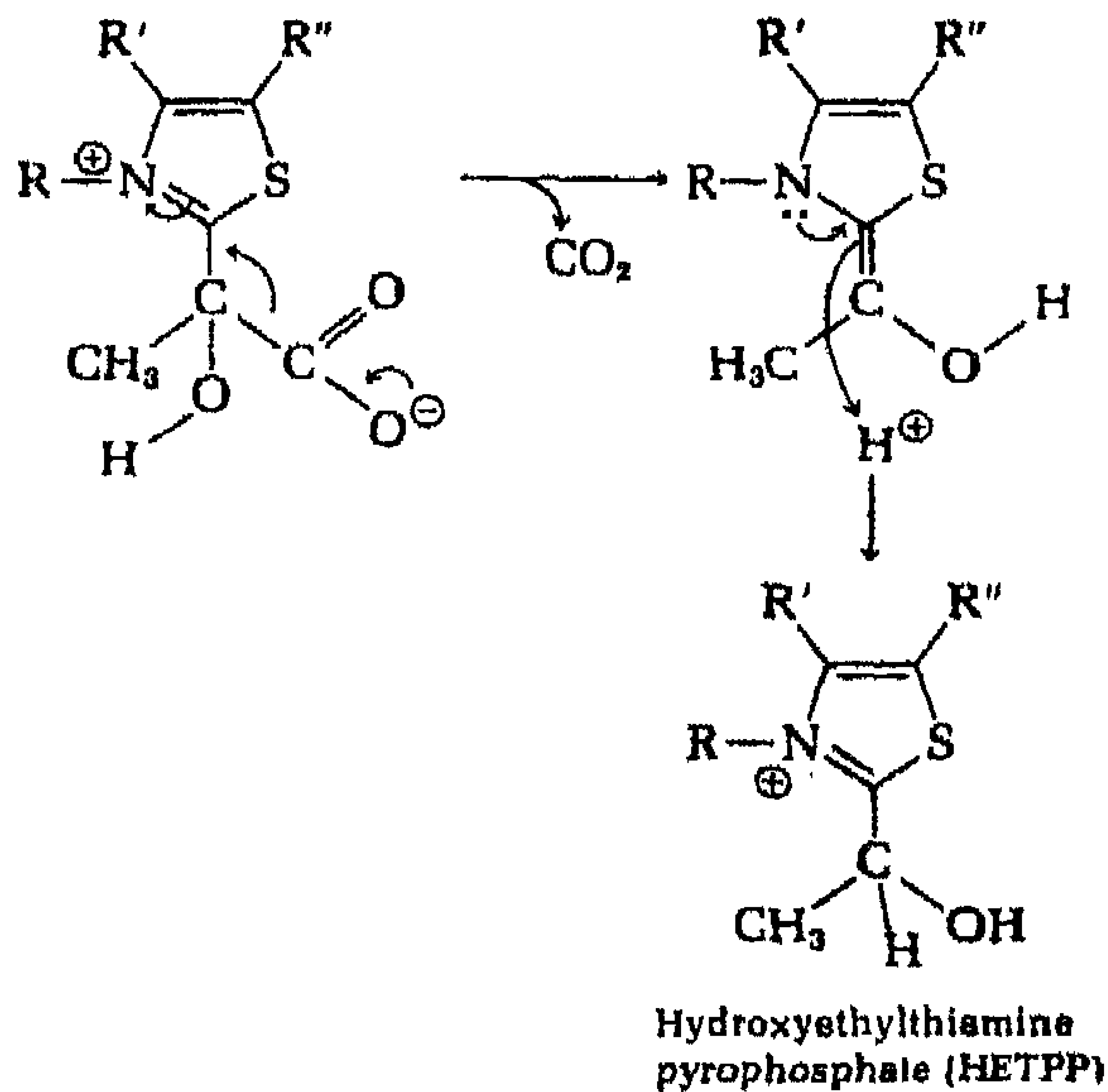
(6 -1)

تكون الخطورة الأولى للتفاعل هجوم الكاربأنيون في الموقع C.2 للمركب Tpp على مجموعة الكيتو للبيروفات (معادلة 1 ـ7):



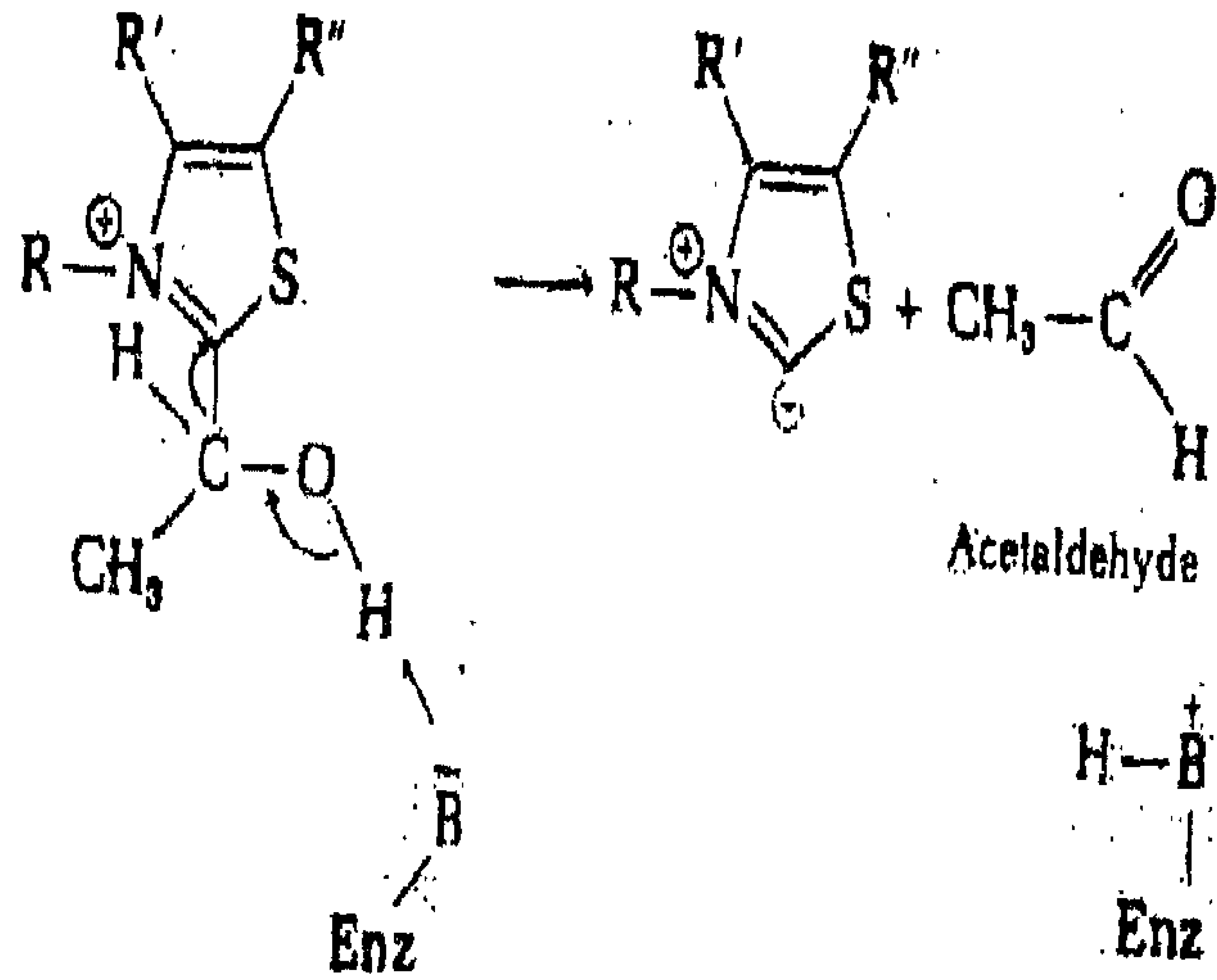
(7 -1)

يتبع ذلك إزالة الكربوكسيل المصاحبة لتدفق الإلكترونات تجاه النتروجين الرباعي. إن فقدان ثاني أوكسيد الكربون (CO_2) يؤدي إلى تكوين (HETPP)H ydroxyethylthiamine pyrophosphate



(8 -1)

ويمكن حصول التفاعل دون مساعدة الأنزيم إلا أن سرعته بطيئة جداً مقارنة بالتفاعل الأنزيمي. في المرحلة الأخيرة للتفاعل يحذف الأنزيم هدروجين مجموعة الهدروكسيل للمركب HETpp وتتدفق الإلكترونات تجاه النتروجين الرباعي ويتكون الاستالدهيد:



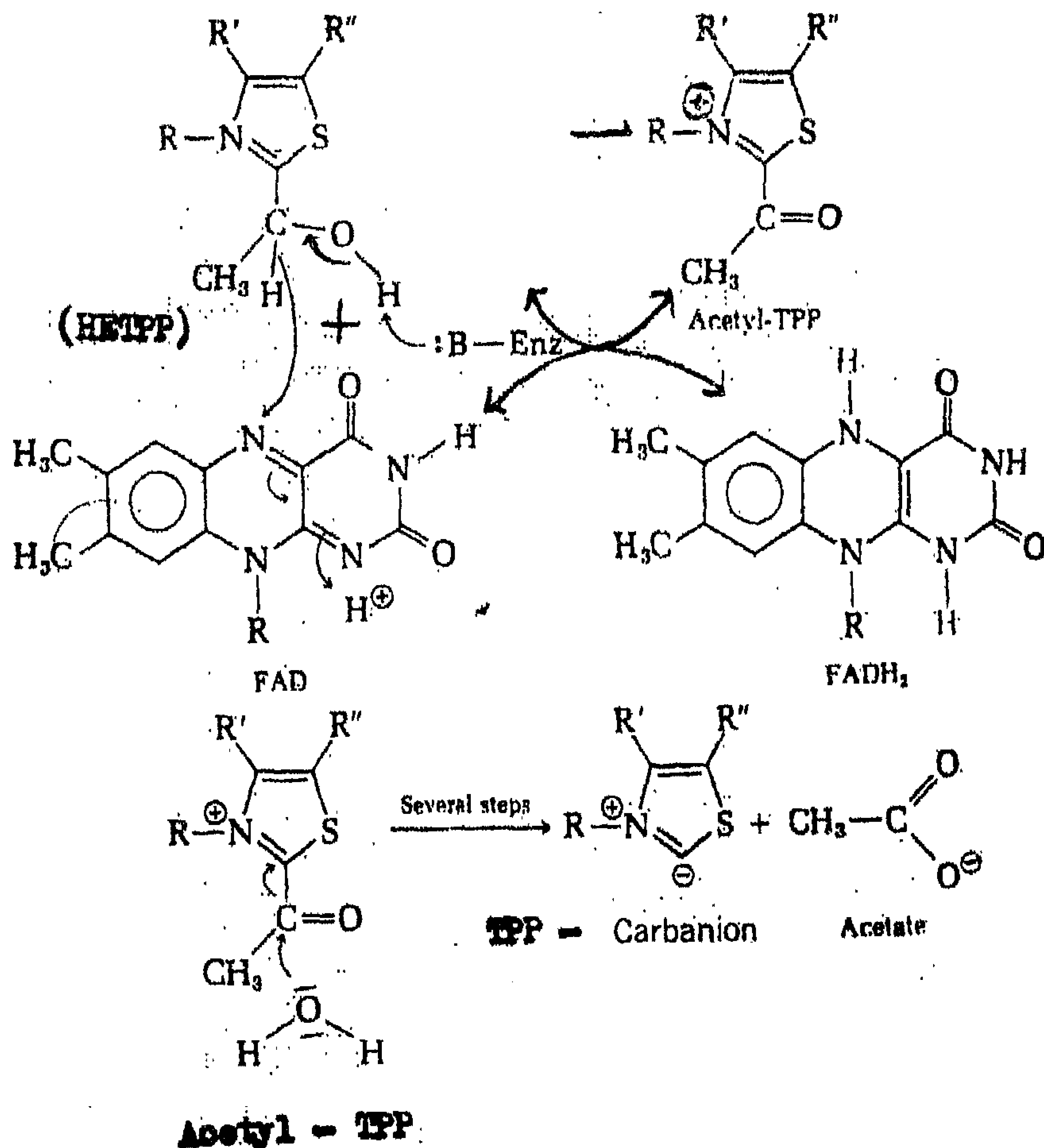
(9 -1)

إزالة الكربوكسيل التأكسدية:

انزيم البكتيريا E.Coli المسمى (اوكسداز البيروفات) Phruvate oxidase يزيل الكربوكسيل من البيروفات لتكوين الاستات وثاني أوكسيد الكربون عوضاً عن الاستالدهيد وثاني أوكسيد الكربون. يحتاج الأنزيم في فعاليته إلى المركب FAD أيضاً، وينتج عن الخطوة الأولى للتفاعل المركب HETPP كما هي الحالة مع أنزيم الخميرة pyruvate decarboxylase.

وفي الخطوة التالية تنقل الهيدروجين الميثامين methine من المركب HETPP إلى FAD ويتكون بذلك $FADH_2$, Acetylthiamine prophosphate

وينتج عن التحلل المائي للمركب Acetyl-Tpp استات وكاربأنيون المركب TPP مستعدة لتحفيز التفاعل مرة أخرى (شكل 1 ـ2).

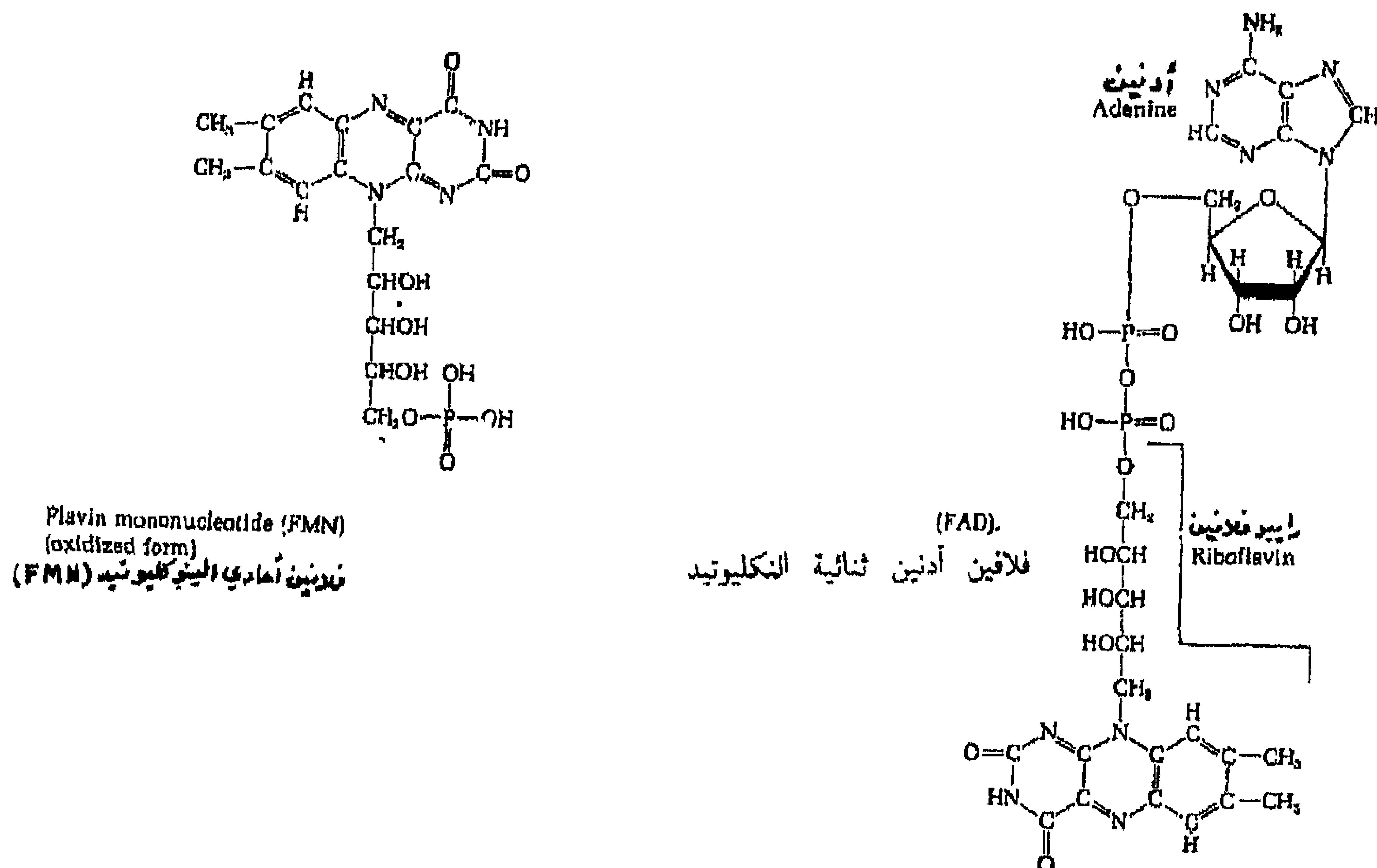


شكل 1-2 نقل هيدورجين مجموعة المثيايين من المركب

FAD إلى Hydroxyethyhiamine (HETPP)

1-4-2 الريبوفلافين

ويسمى أيضاً فيتامين B_2 أو فيتامين G أولا كتوفلافين



1-2-4-1 وجوده:

يوجد تركيز عال للريبوفلافين في عيون الأسماك وفي بعض أنواع السرطان ويعد الحليب وبياض البيض والكبد والقلب والكلى والخضراوات الورقية أفضل المصادر له. ويوجد الريبوفلافين أيضاً بتراكيز جيدة في عضلات البقر والعجل والدواجن وفي المشمش والطماطة أما عضلات الأسماك والحبوب والبقول فهي مصادر فقيرة نسبياً بالفيتامين.

يوجد الريبوفلافين بصيغة حرة يمكن ديلزتها Dialyzable في قرينة العين والشرش whey (يفضل عند تصنيع الجبن) فقط، أما في بقية الأعضاء والأنسجة والخلايا الأخرى. فيوجد بصيغة فلافين أحادي النيوكلوتيد (FMM) أو فلافين ادنين ثنائي النيوكليوتيد (FAD). يوجد الريبوفلافين في الحليب البشري بصيغة FAD

لقد وجد بأن الفلافين أحادي النيوكليوتيد يستطيع تكوين معقدات ضعيفة الارتباط مع مواد غير قابلة للديلزة وكمثال الالبومين.

ويمكن فصل الريبوفلافين عن البروتين بترسيب البروتين بكبريتات الامونيوم.

1-4-2-2 استخلاصه :-

لتحرير الريبوفلافين من البروتين المرتبطة به بصورة طبيعية، يجب معاملة النسيج المهروس بمذيبات مناسبة في درجة حرارة الغرفة أو في درجة الغليان للمذيب. ولقد استخدم لهذا الغرض الكحول الإثيلي والاستون والمحاليل المائية المحمضة وعلى سبيل المثال يمكن الحصول على الريبوفلافين من البناتات الطازجة أو المجففة- وبحصيلة جيدة- بغليها لمدة 45 دقيقة مع 70٪ كحول مثيلي

ولعزل الريبوفلافين من المستخلص، يحبذ إزالة الشحوم أولا باستخلاصها بالأثير (لا يذوب الفيتامين فيه). كما يمكن التخلص من الكلايكوجين بالترسيب الجزئي بالكحول أو الأستون. يمكن استخلاص الفيتامين بالبيوتانول Bantanol ثم يرسب بإضافة الأثير النفطي Petroleum ether يترسب الريبوفلافين باستات الرصاص أو نترات الفضة في محلول متعادل أو بحامض فسفوتنكستك phosphotungstic في 1 عياري حامض الكبريتيك ويمكن استخلاص حامض الفسفوتنكستك بالكحول الأميلي Amyl alcohol. ان نترات الفضة أو كبريتات الزئبق في المحلول الحامضي لا تؤثر في ذوبان الفيتامين ولكنها ترسب بعض المواد الملوثة.

يمكن امتزاز الريبوفلافين من المحلول الحامضي باستخدام Florisil أو Fullers earth أوFloridin XXF ومن أفضل المحاليل الشاطفة Elvantes: محلول البريدين المخفف بالإيثانول أو الميثانول المائي كما يمكن استخدام الأمونيا أو أو. عياري NaOH في 60٪ ايثانول أو 60٪ ايثانول في درجة الغليان أو 80٪ استون. ولعزل الريبوفلافين النقي، يجب استخدام طرق الامتزاز والترسيب سوية.

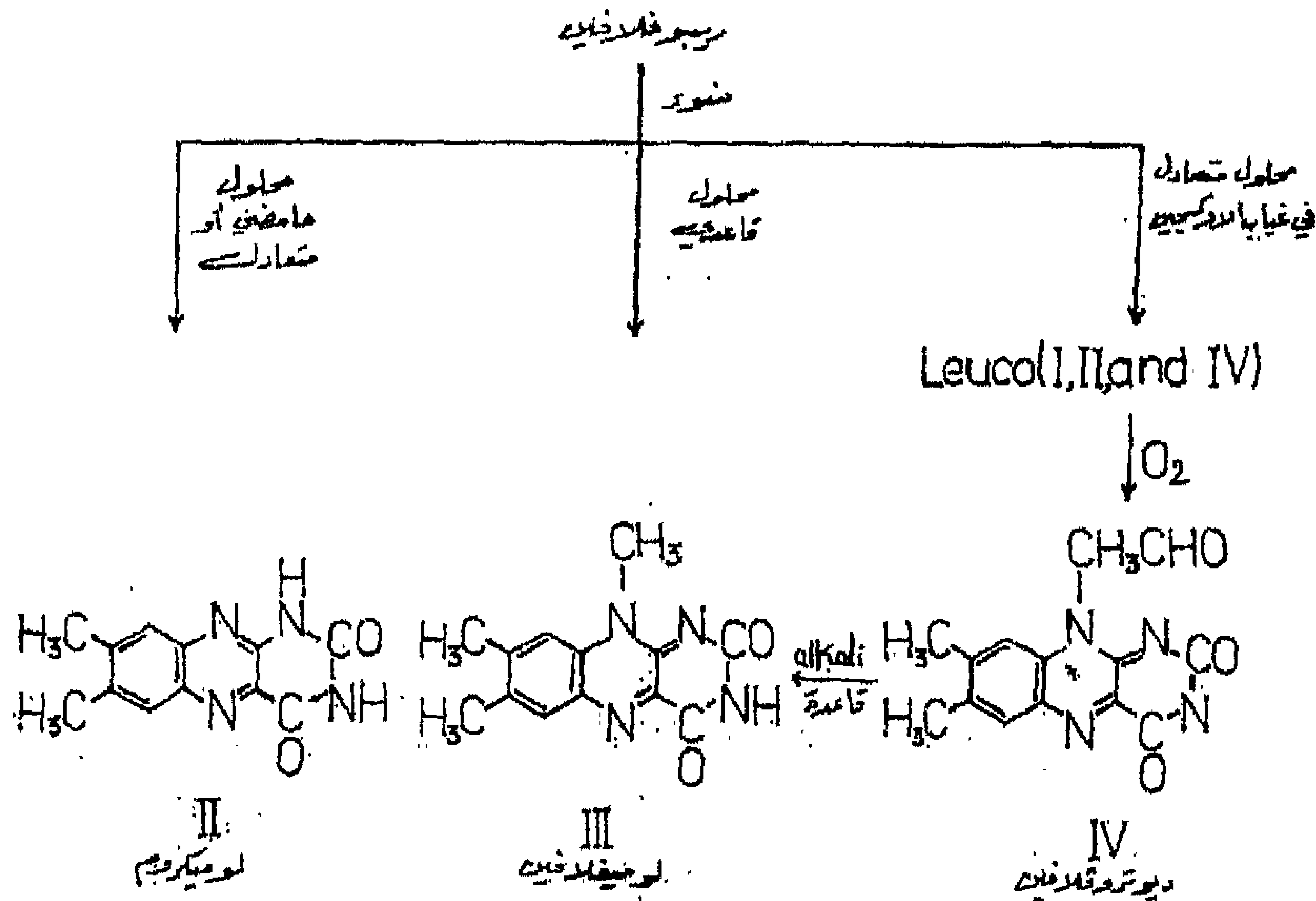
1-4-2-3 الخواص الكيميائية والفيزيائية

تمتلك بلورات الريبوفلافين المتبلورة من 2 عياري حامض الخليك أو الكحول أوالماء أو البريدين، شكلا ابريا ولونا اصفر ـ برتقالياً. درجة حرارة تفكك الفيتامين 278 ـ 282°م وهو عديم الرائحة ومر المذاق. والريبوفلافين قليل الذوبان في الماء (10-13ملغم/100 مللتر في 25 -27.5°م) وذوبانه في الكحول محدود جداً (4.5 ملغم/100 مللتر) وتقل قابيلة الذوبان في الكحول الأميلي والسايكوهكسانول والفينول. تذيب القاعدة الريبوفلافين إلا أن هذه المحاليل غير ثابتة. لا يذوب الفيتامين في الأيثر أو الاستون أو الكلوروفورم أو البنزين.

للمحاليل المتعادلة للريبوفلافين لونا أصفر مخضر. ويظهر طيف الامتصاص قما عند 475 و 446 و359-375 و368 و223 نانوميتر. ولقد استخدم الامتصاص في المنطقة المرئية من الطيف لتعيين الريبوفلافين تظهر المحاليل المتعادلة للريبوفلافين كذلك تآلفا اخضر مصفراً بقيمة عند 565 نانوميتر يمكن استخدامها لتعيين الفيتامين. ويختفي التألق عند إضافة الحامض أو القاعدة. ويظهر أقصى تألق في مدى الرقم الهيدروجيني 3-58 أن التألق الضعيف نسبياً FAD قد ينتج عن اخماد داخلي نتيجة لتآصر جزئي الالوكسازين Alloxazine والأدنين للجزئية ويزداد الاخماد بزيادة التركيز نتيجة لتآصر بين الجزيئات.

المحاليل المائية المتعادلة للريبوفلافين ثابتة نسبياً تجاه الحرارة إذا حجب عنها الضوء ويمكن حتى تعقيمها في الموصدة Autoclave لفترة قصيرة. يتفكك الريبوفلافين في المحاليل الدارئة ذات الرقم الهيدروجيني 6.0.5.0 المحفوظة في درجة حرارة الغرفة (27°م) بمعدل3و2و1٪ في الشهر على التوالي. لا يتعرض الفيتامين لتلف ملحوظ خلال طهي الطعام ولكن إذا تعرضت قناني الحليب لضوء الشمس، فإن أكثر من نصف الريبوفلافين يفقد في ساعتين. وتزداد نسبة التلف بزيادة درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني. يؤدي تسحيح المحلول القاعدي للريبوفلافين – وخصوصا في الطول الموجي 420-560 نانوميتر- إلى تحول

الريبوفلافين إلى Lumiflavin الذي يمتلك مجموعة مثيل عوضا عن ثمالة ريبتول في الموقع 9 (شكل 1-3). أما تشعيع محلول الريبتول الحامضي، فينتج عنه Lumichrome الذي يفتقر إلى ثمالة الريبوتول (شكل 1-3).



شكل 1-3 مخطط يوضح تأثير تسحيح الريبوفلافين في محاليله المتعادلة والحامضية والقاعدية

لا يتأثر الريبوفلافين بالحوامض أو الهواء أو المواد المؤكسدة (فيما عدا Kmno₄ و potassium persulfate مثل البروم وحامض النتروز). وتعتمد إحدى الطرق الناجحة جدا في تنقية الفيتامين على هذه الحقيقة، إذ تؤكسد الشوائب في محيط حامضي في درجة حرارة أقل من 100°م باستخدام Cl_2 أو H_2O_2 أو HNO_3 أو $HCLO_3$

1-4-2-4 تعيين الريبوفلافين

يمكن تعيين الريبوفلافين كيميائيا أو باستخدام الأحياء المجهرية وإذا كان تركيز الريبوفلافين عاليا نسبياً، فإن من الممكن استعمال طريقة كيميائية وكمثال طريقة اللوميفلافين Lumiflavin والتي تعتمد على حقيقة

تحول الريبوفلافين إلى لوميفلافين عند تعريضه للضوء. ويمكن قياس شدة التألق في المنطقة فوق البنفسجية. كما أن التعيين البولاغرافي للريبوفلافين مناسب عمليات لخصوصيته وسهولته:

عند تعيين المحتوى الكلي لفيتامين B_2 في الغذاء، يجب أولا تحرير الفيتامين الموجود بشكل استر مع حامض الفسفوريك أو بشكل ثنائي النيوكليوتيد أو المرتبط بالبروتين. ويتم ذلك باستخدام انزيم يشطر ثمالة (Resdidue) الفسفات وكمثال (Clarase)

1-4-2-5 انتاج الريبوفلافين

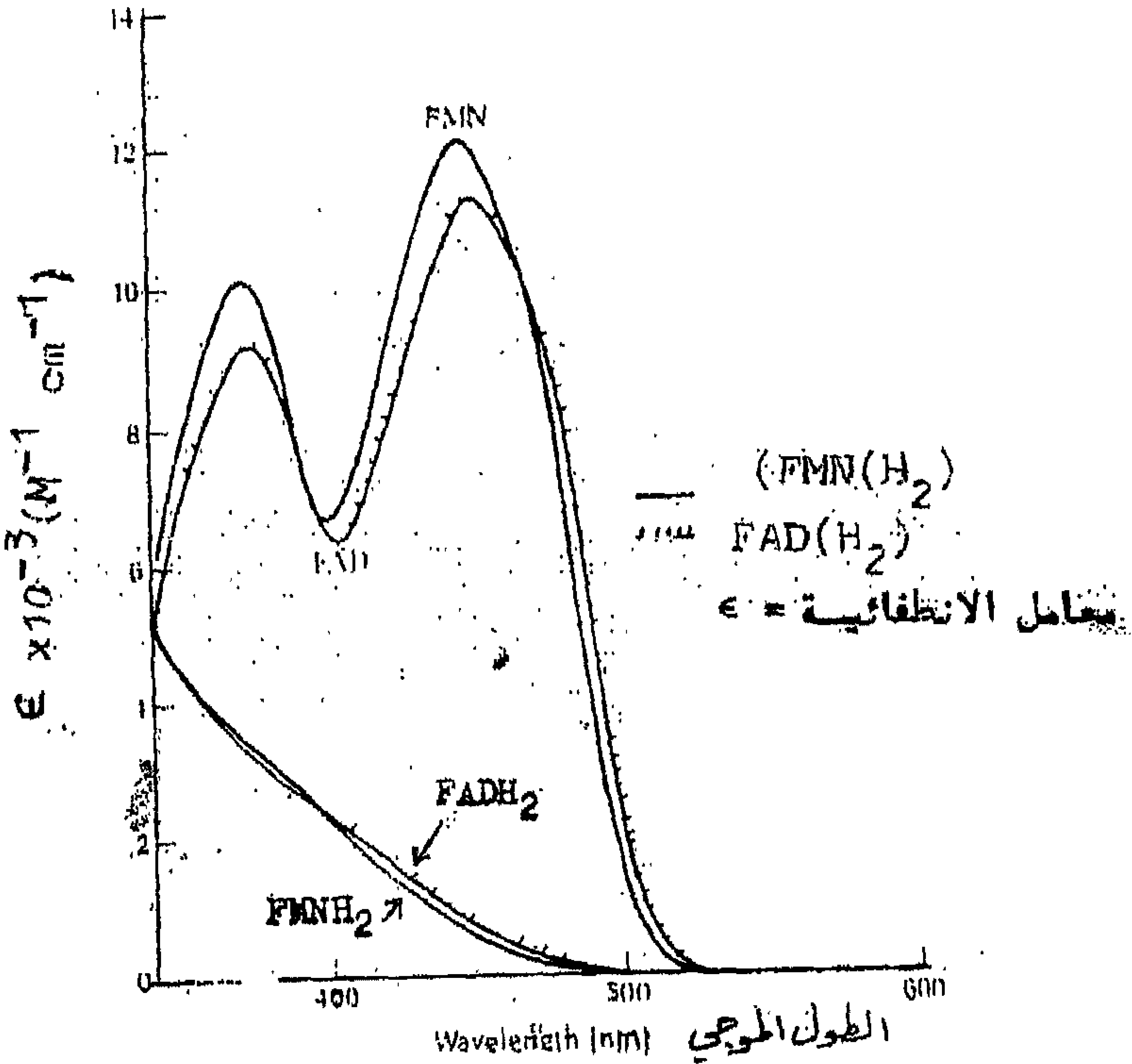
يمكن تحضير الريبوفلافين تجاريا بالتركيب الكيميائي وتستخدم مصادر طبيعية مختلفة لإنتاجه باستخدام الأحياء المجهرية المخمرة Fermenting microorganisms. وعلى سبيل المثال معاملة الشرش whey ونواتج الحليب الأخرى بالخمائر المخمرة للاكتوز وخاصة Saccharomyces fragilis أو عدة أنواع من Lactobacillus أو الاعفان وكمثال Aspergillus niger و Aspergillus flavns و penicillium Chrysogenum يحضر الريبوفلافين تجاريا باستخدام Eremothecium ashbyii ويتم التخمر الهوائي في المستنبت Culture بوجود تهوية وتحريك مستمرين.

ويمكن استخدام المستنبت الصلب (وكمثال Germ rice, Germ wheat ويقال بأن إنتاج الريبوفلافين قد يصل إلى 20 ملغم/غم.

1-4-2-6 الوظيفة الكيميائية الحياتية

الصيغة الفعالة لفيتامين B_2 هي FMN أو FAD، وتسمى الأنزيمات التي تتطلب وجود FMN أو FAD باسم Flavoenzymes. تعني كلمة Flavin باللاتينية (اصفر) والسبب لهذه التسمية يعود للون الفلافينات الأصفر البراق. وعند اختزال حلقة الايزوالوكسازين Isoalloxazine للتميم الأنزيمي FMN أو

FAD يصبح التميم الأنزيمي المختزل عديم اللون لفقدان النظام الالكتروني TT الممتد. يوضح الشكل (1-4) طيف الامتصاص للتميمات FMIN أو FAD ويستخدم التغير في طيف الامتصاص كمؤشر لفعالية الفلافوانزيمات.



شكل 1-4 طيف الامتصاص للتميمات الأنزيمة FMN وFAD بصيغتها المختزلة والمؤكسدة

تحفز الفلافو إنزيمات Flavoenzymes تفاعلات أكسدة واختزال مختلفة. يوضح الجدول 1-5 الأصناف الرئيسية للفلافونزيمات وأنماط Types الركائز Substrates المؤكسدة أو المختزلة.

جدول 1-5 الأصناف الرئيسية للفلافوانزيمات **Flavonezymes**

الأنزيمات	الفعالية التحفيزية
Dehydrogenases (مزيلات الهدروجين)	تستخدم متقبل لالكترون واحد غير الاوكسجين الجزيئي، وغالبا ما ترتبط وظيفيا بالسلسة التنفسية المرتبطة بغشاء خلوي.
الاوكسدازات Oxidases	تستخدم الأوكسجين الجزيئي O_2 بمثابة متقبل للالكترونات ويختزل إلى H_2O 2
اوكسيدازات- مزيلات الكربوكسيل Oxidases- decarboxylases	إزالة CO_2 وأكسدة بأربعة الكترونات. يتحول $H_2O \leftarrow O_2$ $S+O_2 \rightarrow S-OH+H_2O$
انزيمات الهدركسلة Hydroxylases	
الفلافو انزيمات الفلزية Metaloflaveonzymes	تتطلب عنصرا انتقاليا مرتبطا بها لتظهر فعاليتها

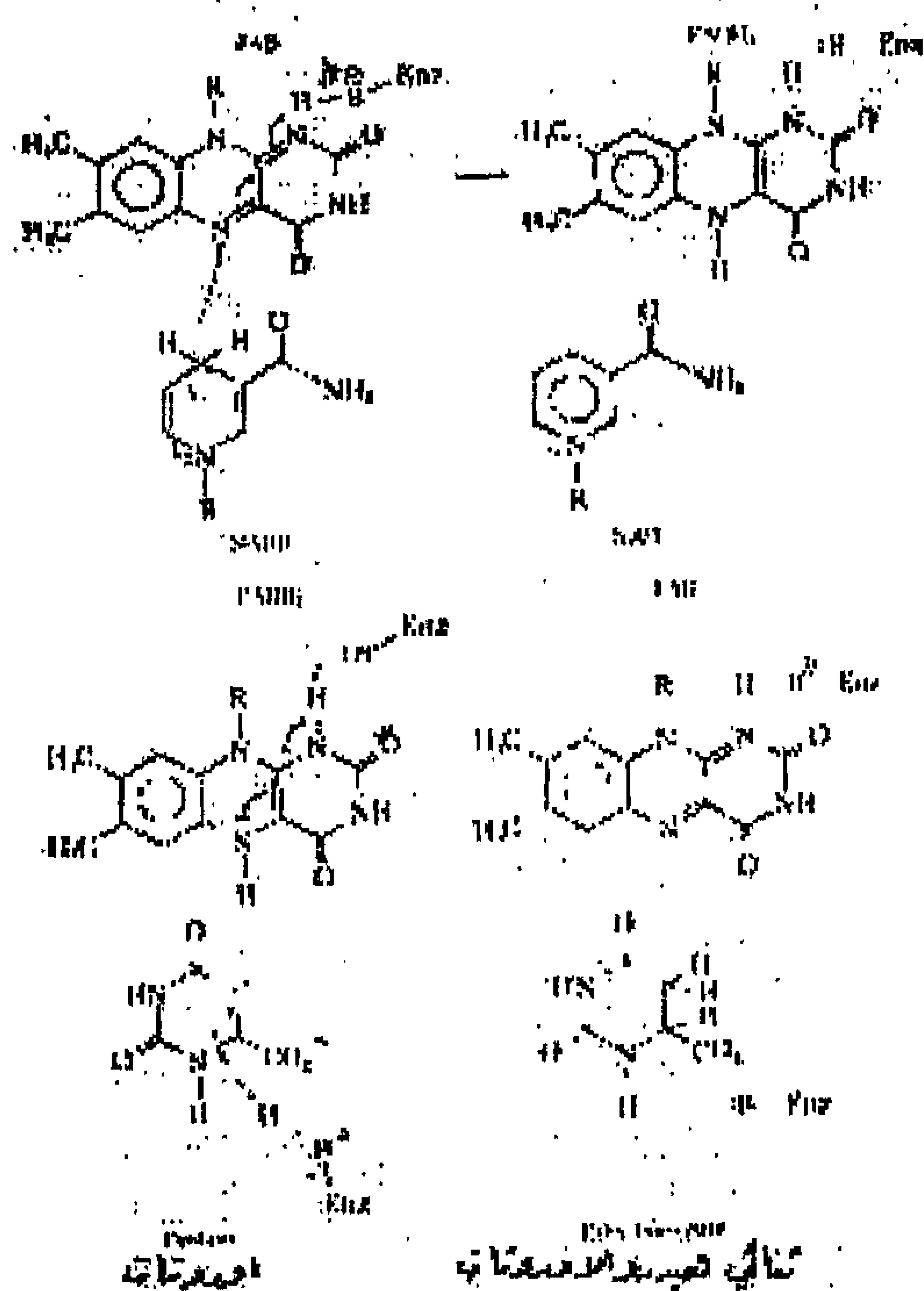
آليات عمل بعض أنزيمات الفلافوبروتين المزيلة للهدروجين

Mechanisms of action of some flavoenzyme dehydrogenases.

تظهر الفلافوانزيمات مدى واسعا للاليات التي لم يفهم العديد منها لحد الآن ولا يمكن وصفها بصورة إجمالية، فبعض الفلافوانزيمات تحفز نقل ايون الهدريد Hydride والبعض الآخر يحفز نقل الكترون واحد بصورة متتابعة وتتكون الجذور الحرة Free radicals بوصفها مركبات وسطية في عمليات النقل هذا بينما يحتاج الصنف الآخر من الأنزيمات إلى أيونات فلزية لفعاليتها. إن هذه الأنزيمات الحاوية على الفلزات، تحفز تفاعلات نقل الكترون واحد أو الكترون وسوف نتناول فيما يلي بعض آليات عمل الفلافوانزيمات.

أ. النقل المباشر للهدريد Direct hydride transfer

يساهم الانزيم Dihydroorotate dehydrogenase في تخليق اليوردين أحادي الفسفات Ump في مسلك دي نوفو De novo لتخليق نيوكليوتيدات البريميدين وهو مثال للأنزيمات التي تحفز نقل أيون الهدريد. يحتاج الأنزيم أيضاً إلى +NAD في عمله ويحصل التفاعل المخفز بنقل أيون الهدريد من NADH إلى FAD ويتبع ذلك نقل أيون الهدريد من $FADH_2$ إلى الاوروتات Orotate. يتكون الأنزيم dehydrogenase Dihydroorotate من أربع دون وحدات Subunits ويحتوي على FMN و FAD وذرتي حديد تتذبذب حالات الأكسدة لهما خلال التفاعل بين (II) و (III) و Fe(III). ويوضح الشكل 1-5 الآلية المقترحة للتفاعل.

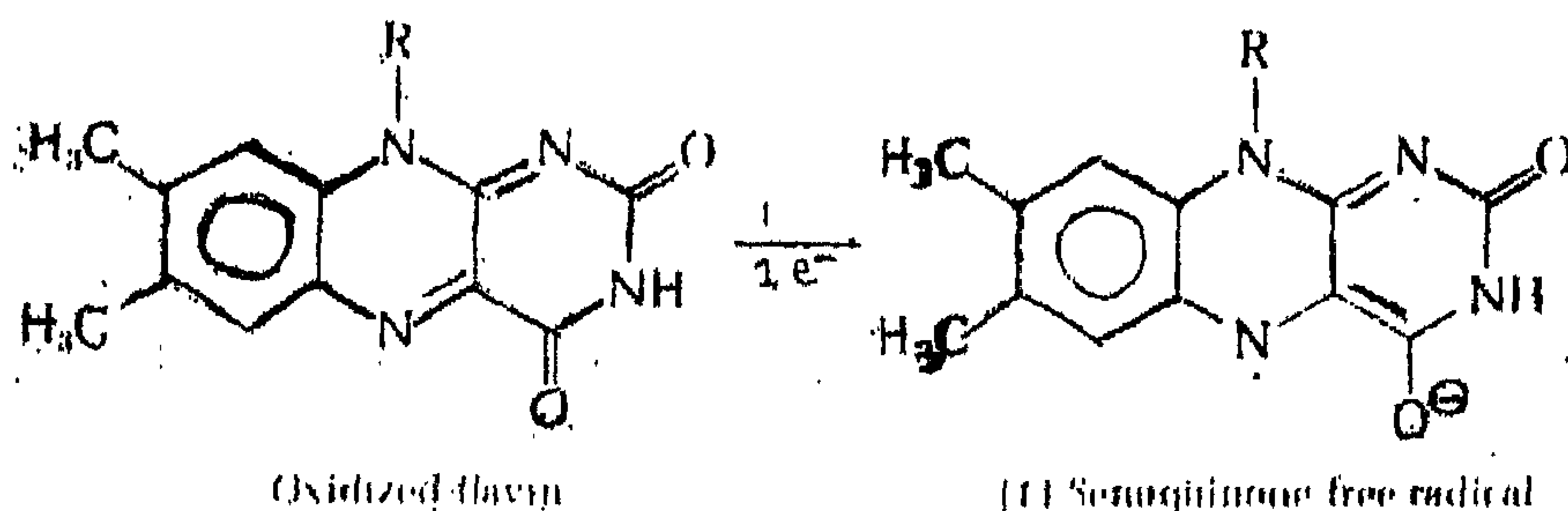


شكل 1-5 الآلية المقترحة لعمل الأنزيم Dihydroorotate dehydrogenase

يشتمل التفاعل على النقل المتتابع للهدريد. هناك مراحل وسطية غيرمفهومة تشتمل على أكسدة واختزال ذرة حديد في الفلافو أنزيم (المصدر 10).

ب. نقل الكترون واحد: انصاف الكوينون Semiquinones

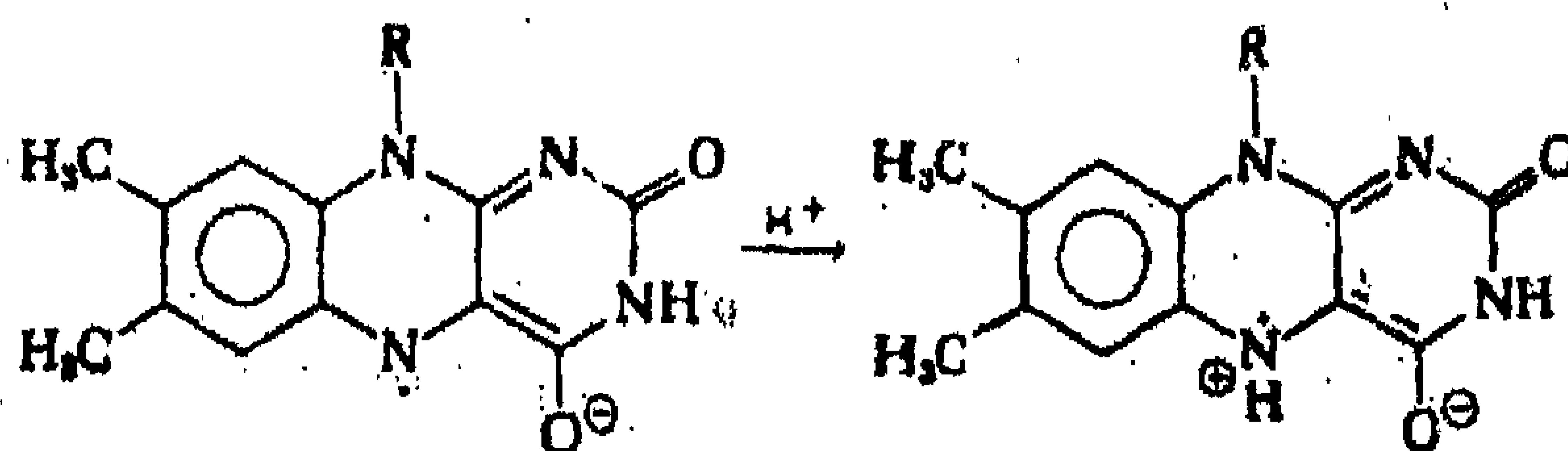
تختزل الفلافينات على مراحل تتضمن كل منها نقل الكترون واحد. إن هذه التفاعلات أكثر تعقيداً من تفاعلات نقل الهدريد. ينتج عن نقل الكترون واحد من الركيزة Substrate إلى الفلافين جذر حر لنصف الكوينون Semiquinone ويظهر قمة امتصاص عند 480.



Oxidized flavin
فلافين مؤكسد

(1) Semiquinone free radical
المركب (١)
الجذر الحر لنصف الكوينون

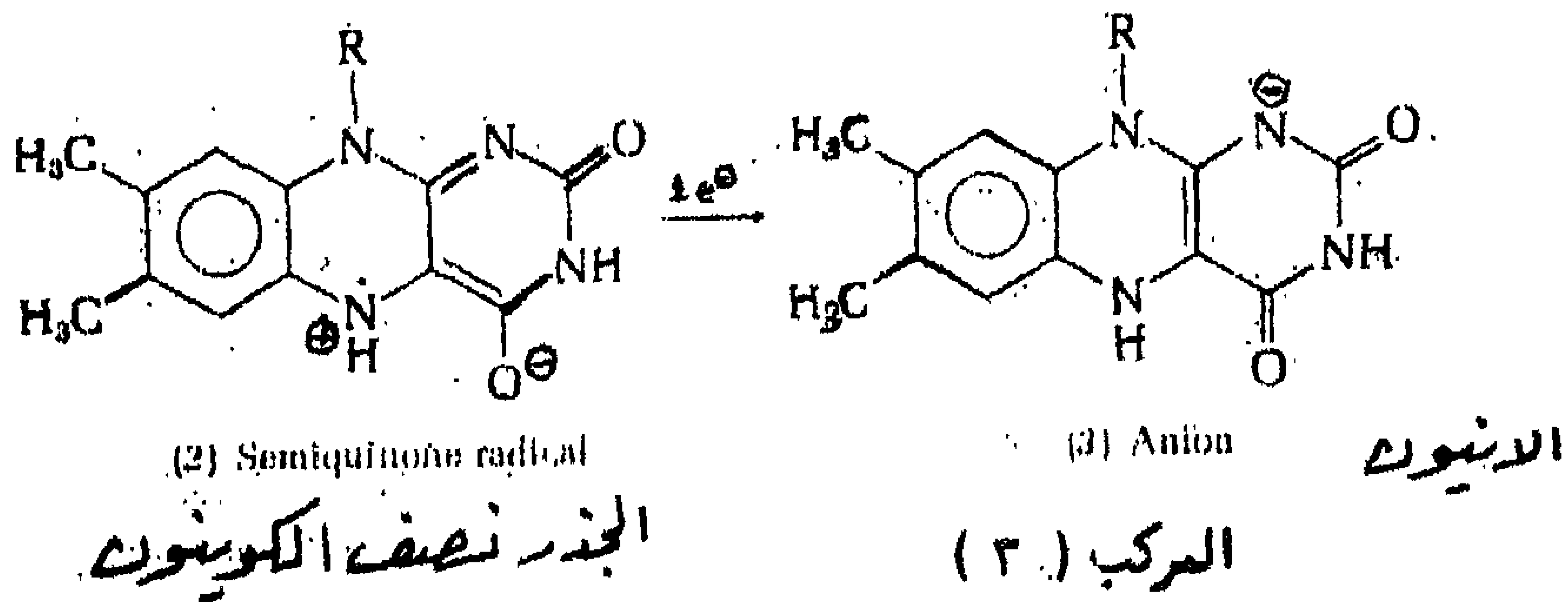
تمتلك حلقة الإيزوا لوكسازين محصلة شحنة 1− عندما تكون بشكل جذر Semiquinone (المركب) ويظهر هذا الانيون قمة امتصاص عند 480 نانوميتر ويكون لونه احمراً ساطعاً. تؤدي برتنة Protonation الجذر الأنيوني إلى معادلة شحنته السالبة ويصبح لونه ازرقاً (يظهر قمة امتصاص عند 570 نانوميتر) (المركب2):



(1) Radical anion
الجذر الانيوني

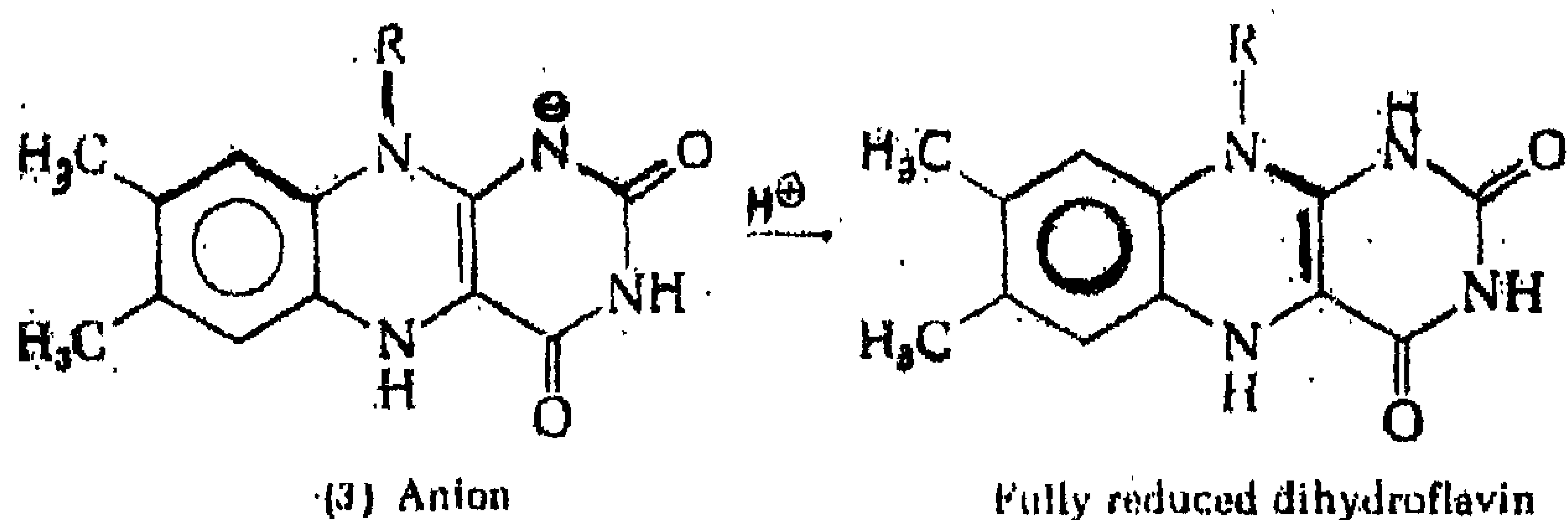
(2) Neutral radical
(λ_{max} 570 nm, blue)
المركب (٢)
الجذر المعادل

إن نقل الكترون آخر إلى المركب (2) يؤدي إلى تكوين الانيون (3):



(11 -1)

يلتقط الانيون (3) بروتون لتكوين ثنائي هدروفلافين المختزل كلياً:



الأنيون (13 -1)

ثنائي هدروالفلافين المختزل كلياً (12 -1)

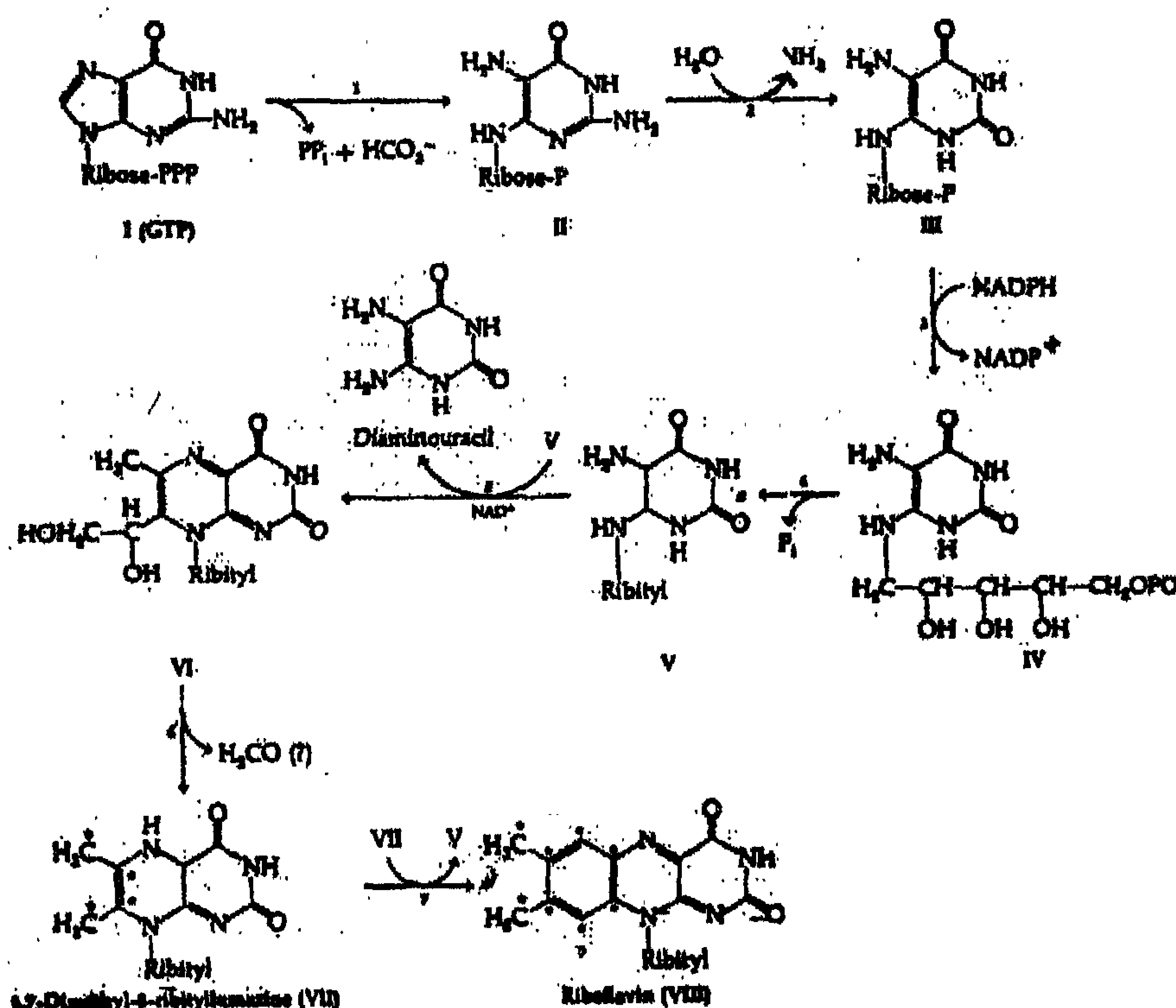
تكون جذور انصاف الكوينونات ثابتة لأن الكتروناتها غير المزدوجة Unpaired تستطيع أن تغادر موضعها وتدخل في النظام II لحلقة الايزوالوكسازين.

إن ثبات جذور نصف الكوينون يمكنها من العمل بمثابة مركبات وسطية بين تفاعلات نقل الالكترون الواحد والالكترونين كما يحصل في عملية التنفس.

1-4-2-7 التخليق الحيوي

يتم تخليق الريبوفلافين في النباتات الخضراء وفي معظم البكتيريا والعفن ولا يمكن ذلك في الحيوانات وتستخدم لغرض التخليق، جميع ذرات الكربون والنتروجين للكوانين عدا عن C-8 لحلقة البيورين.

يوضح الشكل (1-6) مسلك تخليق الزيبوفلافين المقترح بناء على الدراسات الكيميائية الحياتية والوراثية على الخميرة والإعفان الأخرى والبكتريا E. coli يمثل الكوانوسنين ثلاثي الفسفات GTP (انظر I) مثيضة وسطية اجبارية كما في حالة تخليق حامض الفولك. إن مبادلة المجموعة الأمينية في المشتق II.



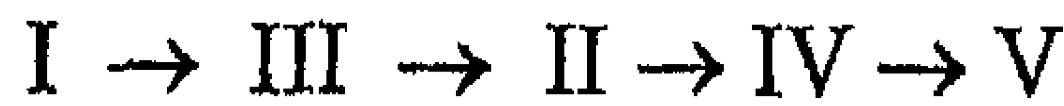
شكل 1-6 المخطط المقترح لتخليق الريبوفلافين في البكتريا والخميرة والعفن.

يفتح المركب الكوانوسين ثلاثي الفسفات GTP بانزيم Cyclohyrolase مع فقدان ppi وكربون رقم8 (تتفاعل1) بتبع إزالة مجموعة الامين (تفاعل 2) اختزال فسفات الريبوسيل إلى فسفات الريبتيل (تفاعل 3) في البكتريا E.coli وأما في الخميرة فيتقدم التفاعل 3 على التفاعل 4. يحفز انزيم الفسفاتاز تحول VI إلى V. يتطلب تكوين المركب VI جزيئتين من V.

إن فقدان وحدة كربون (ربما يشكل فورمالدهيد) يعطي VII يحول الأنزيم Riboflavinsynthetase جزيئتين من VII إلى ريبوفلافين وجزيئة V يعاد استخدامها في تفاعل (5).

6-Oxy-2.4.5- Triamino Pyrimidine بمجموعة كيتون يعطي المركب III 5 -Amino -2.6 - dioxy-4(1-ribosylamino-D) pyrimidine.

يتراكم هذان المركبان في مزارع الخمائر المطفرة المفتقرة إلى الريبوفلافين -deficient mutants-flavin Ribo. إن تحول المركب III يشتمل على اختزال المشتق -Ribosyl phosphate D تزال بفعل أنزيم فسفاتاز لتكوين المركب (V). تمثل سلسلة التفاعلات المذكورة ما يحصل في البكتريا E.coli إما في الخميرة Ashbya فيعتقد بأن التسلسل هو:



تتطلب الخطوة التالية جزيئتين من المركب (v)



لتكوين (6- Methyl- 7- dihydroxyethyl- γ - ribityllum & Zine VI) و Diaminouracil ناتجاً عرضياً. ولإضافة سلسلة الريبتال الجانبية من إحدى جزيئتي المركب (V) إلى الأخرى، يتطلب التفاعل كمية ضئيلة من NAD+ ويعتقد بأنه يختزل أولا إلى NADH ثم يعاد أكسدته إلى NAD+.

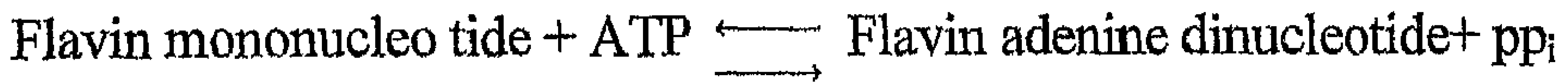
يشتمل تحول المركب (VI) إلى II (-&-ribityllum &Zine) -Dimethy III6.7) فقدان وحدة كربون ربما بصيغة فورمالدهيد.

يكتمل تخليق الريبوفلافين بالأنزيم Riboflavin synthase (التفاعل7) الذي يمتلك مواقع ارتباط لجزيئتي Lumazine (Vii) تتكسر حلقة Diazine لجزيئة واحدة ويضاف جزء رباعي الكربون لجزيئة ثانية Lumazine كما موضح بتوزيع C^{14} المؤشر ازاءه (شكل 1-6) وهكذا تتكون جزيئة Riboflavu (VII) وجزيئة (V) يحافظ عليها ويعاد استخدامها لتكوين Lumazine (VII).

يمكن تخليق أحادي نيوكليوتيد الفلافين FMN من الريبوفلافين في الأنسجة الحيوانية بتفاعل محفز بالأنزيم Riboflavin kinase


Riboflavin +Tpp → Flavin mononucleo tide (FMN) +ADP

ويمكن تكوين fAD من FMN بتفاعل عكوس يحفزه الأنزيم FMN adenyl- transferase


Flavin mononucleo tide + ATP ⇌ Flavin adenine dinucleotide+ pp_i

FMN FAD

لا تستطيع بعض البكتريا تخليق الريبوفلافين ويمثل عامل جوهري للعديد منها وخصوصا lactobacilli إن سرعة إنتاج الحامض بواسطة هذه الأحياء المجهرية نسبة إلى كمية الفيتامين في الوسط يمثل أساس الطرق الكمية لتقدير الريبوفلافين.

تمثل أبسط الطرق لتعيين الريبوفلافين قياس تألق محاليله

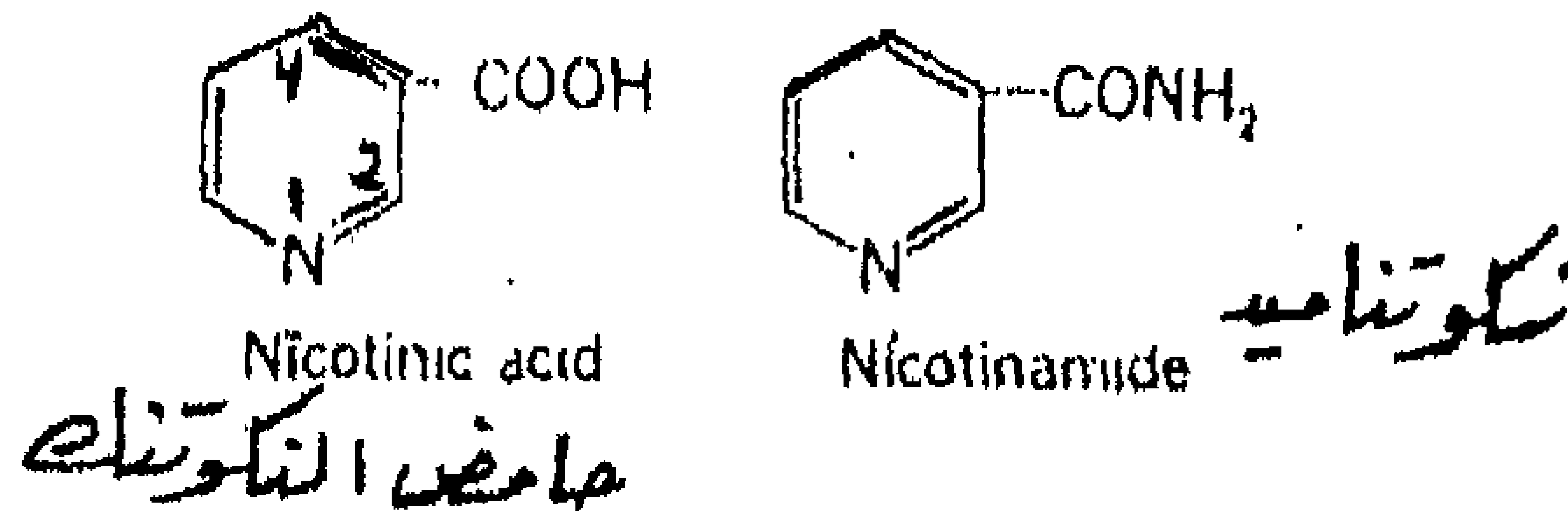
Fluorescence measare ment

1-4-3 حامض النكوتنك أو نياسين

تعطى التسمية نياسين لحامض النكوتنك واميده Nicotinamide ولكلا المركبين فعلا حيوياً واحداً ذلك لإمكانية تحول أحدهما إلى الآخر في الكائن الحي.

يمتلك حامض النكوتنك درجة انصهار 234-237°م (تصعيد)، ويذوب في الماء والكحول ونظراً لكونه امفوتيري. فهو يذوب بصورة أفضل في الحوامض والقواعد مما في الماء وتكون المحاليل الحامضية والقاعدية والمتعادلة لحامض النكوتنك شديدة الثبات.

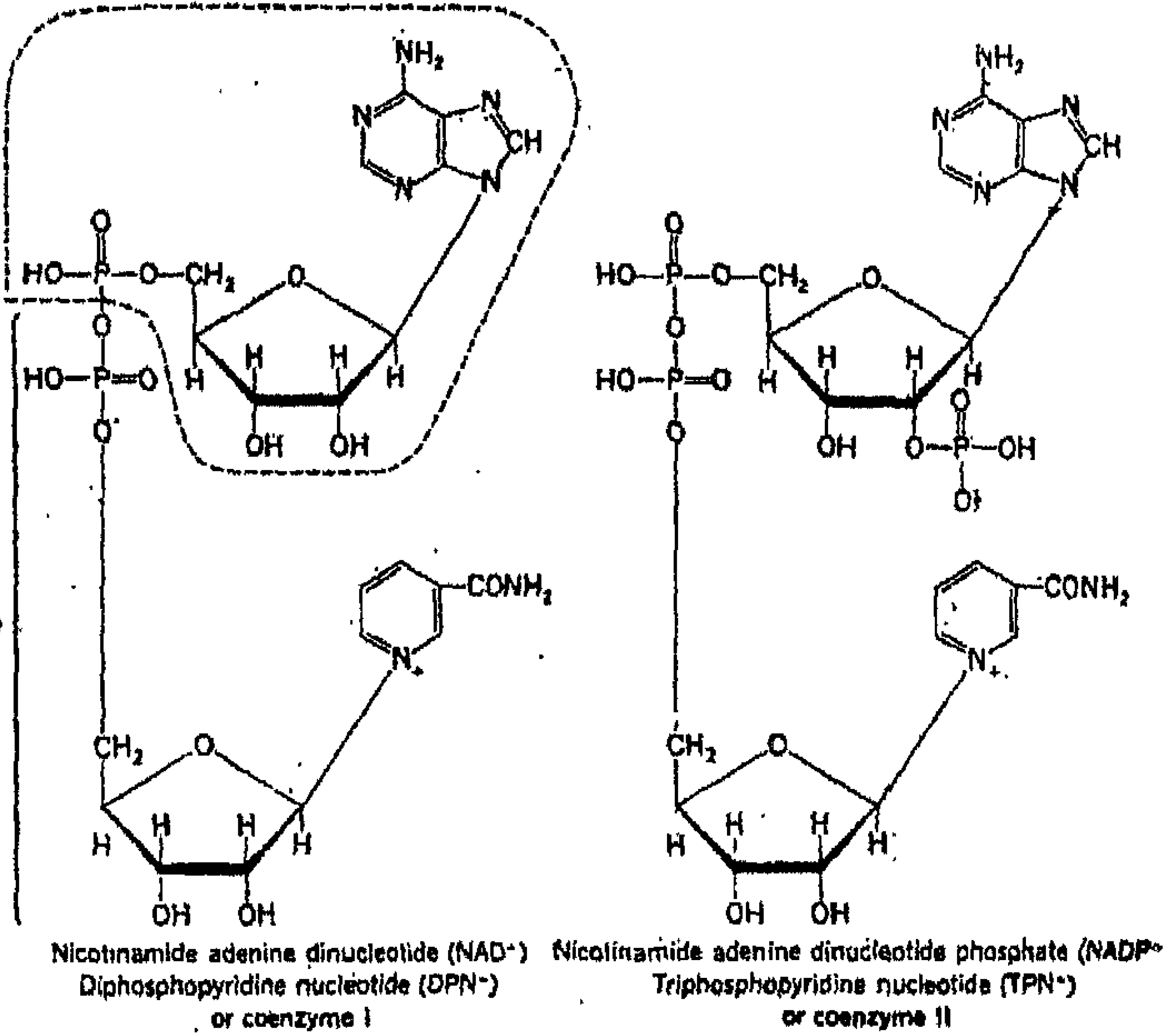
ينصهر اميد حامض النكوتنك عند 128-131°م ويكون سريع الذوبان في الماء وفي 95٪ كحول وفي الكلسيرول. يمتلك حامض النكوتنك واميده طيف امتصاص في المنطقة فوق البنفسجية بقمة عند 260 نانوميتر.



1-4-3-1 وجوده ووظيفته الحيوية

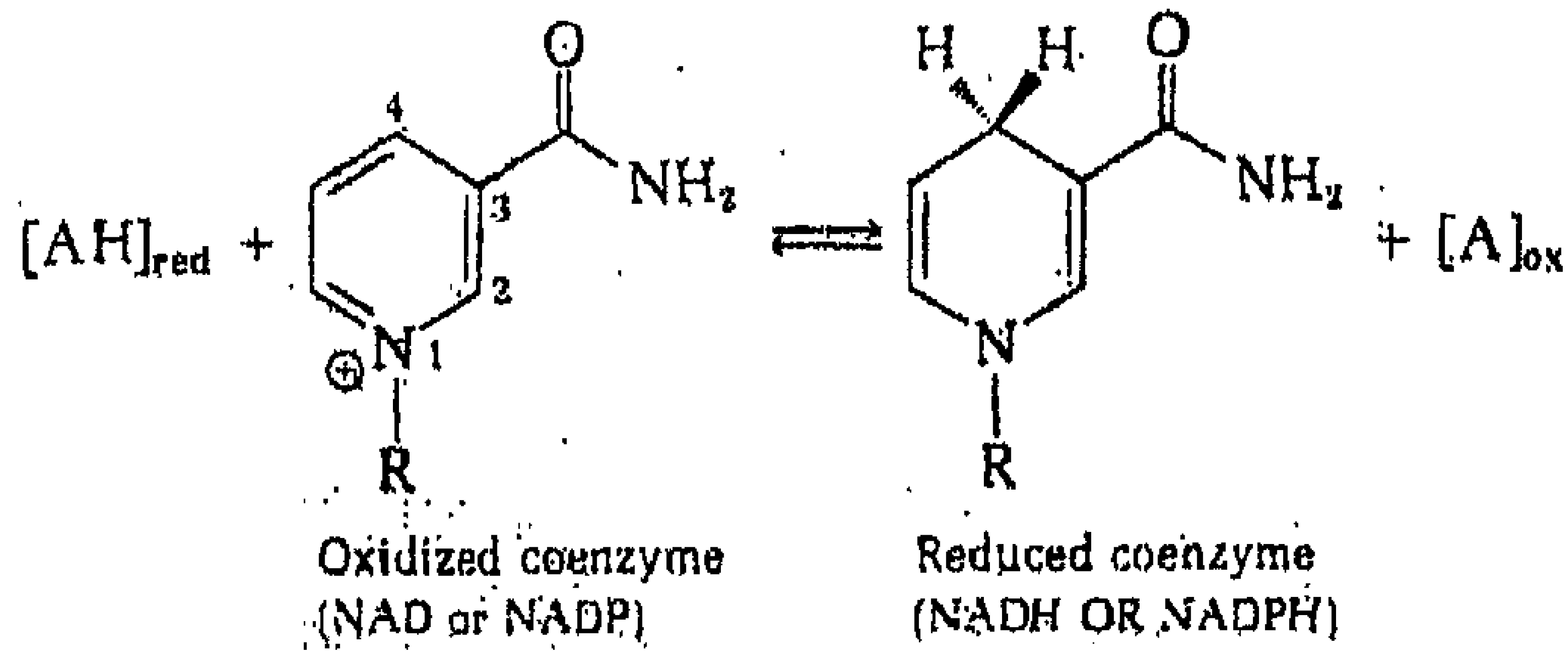
ينتشر حامض النكوتنك في الأنسجة النباتية والحيوانية وتعد منتجات اللحوم مصادر غنية به يكون حامض النكوتنك فعالاً في جسم الإنسان بصيغة تميمين Coenzymes: نكوتناميد ادنين ثنائي النيوكليوتيد NAD+ ونكوتناميد ادنين ثنائي النيوكليوتيد المفسفر NADP+.

ولقد كان NAD+ يسمى سابقاً Coenzyme أو phopyridine (DPN+) nudeotide أو التسمية القديمة للمركب NADP+ فهي Coenzye أو Triphosphosph opyridine nuclotide، وكما يتضح من الشكل (1-7) فإن ثنائي النيوكليوتيدات هذه تتكون كيميائياً من أحادي النيوكليوتيد ادينوسين أحادي الفسفات AMF ونيوكليوتيد مزيف لأن النيكوتين اميد ليس مشتقاً للبيورين أو البريميدين.



شكل (7-1) تركيب التميمين الأنزيميين NAD^+ و$NADP^+$

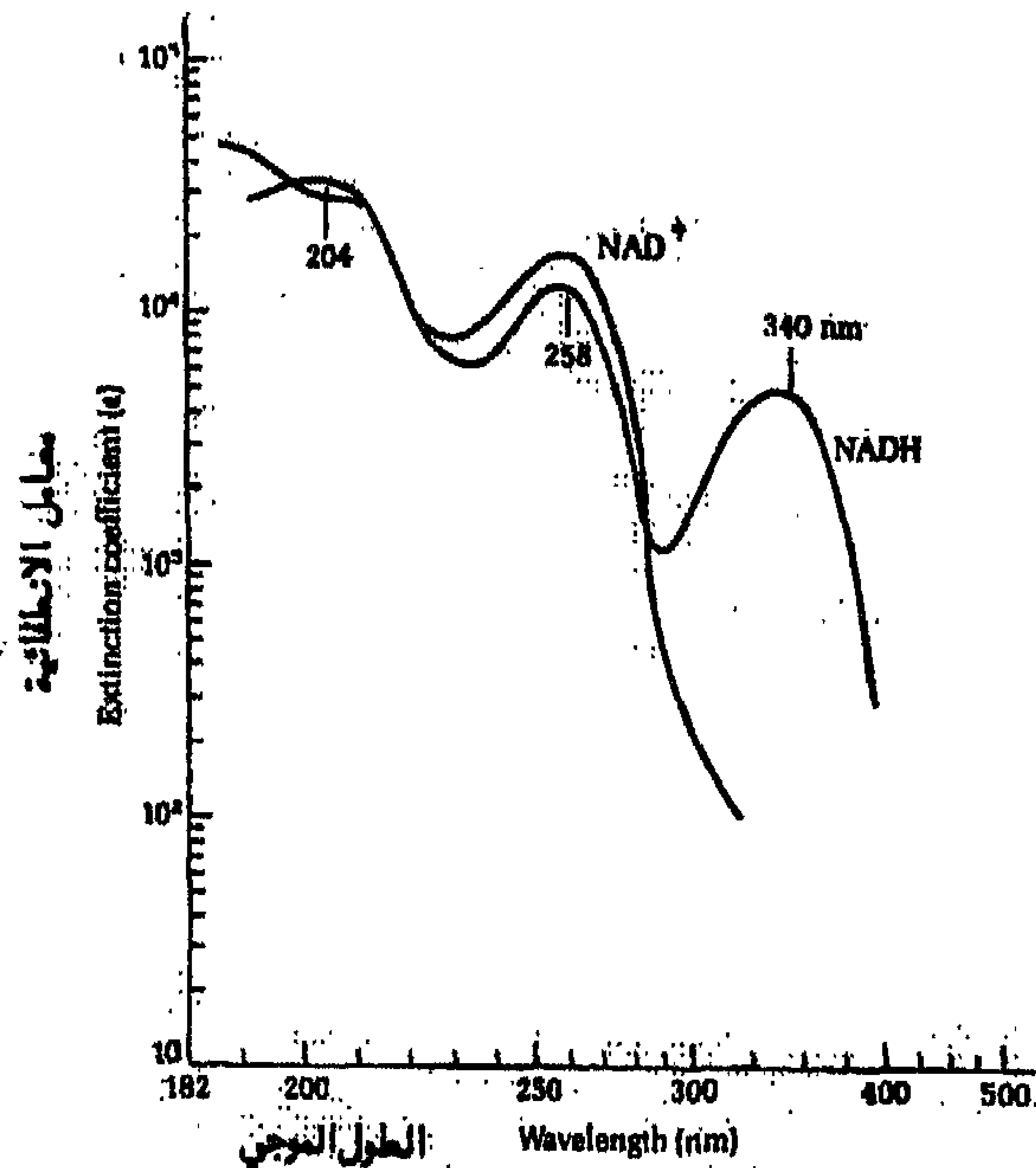
يساهم التميمين +NAD, +NADP في مجموعة واسعة من تفاعلات الأكسدة والاختزال. إن الجزء الفعال للـ +NAD , +NADP هو الموقع 4 لحلقة البريذين التي تتقبل أو تهب انيون هدريد. إن ذرة النتروجين موجبة الشحنة لحلقة البريدين تعمل بمثابة حوض الالكترونات وبذلك تساعد في نقل الهيدروجين مع زوجه الالكتروني (ايون الهدريد) من الركيزة AH إلى التميم الأنزيمي (+NAD أو +NADP).



التميم الأنزيمي المؤكسد   التميم الأنزيمي المختزل

(14-1)

يمكن تتبع تفاعلات اكسدة NADH (أو اختزال)(+NAD) بسهولة (شكل 1-8) باستخدام المطياف ذلك لأن طيف الامتصاص في المنطقة فوق البنفسجية للجزيئتين متميز وكذلك الحال للتميم الأنزيمي NADPH.



شكل (1-8) طيف الامتصاص في المنطقة فوق البنفسجية للتميم الانزيمي **NAD** بصيغته المؤكسدة **+NAD** والمختزلة **+NADH**

على الرغم من اختلاف +NAD عن +NADP بمجموعة الفسفات في الموقع 2 لنيوكليوتيد الادنين بعيدا عن الموقع النشط لكل من الجزيئتين، إلا أن المسالك الأيضية التي يشتركان فيها تختلف بوضوح. يشترك +NAD بصورة رئيسة في عمليات التقويض catatbolic بينما يعمل +NADP في مسالك الأبتناء.

إن وجود مجموعة الفسفات في الموقع 2 يغير من قدرة التميمين +NAD و+NADP لربط الأنزيمات التي تحتاجها حيث أن لمعظم الأنزيمات المتطلبة للـ +NAD الفة واطئة للـ +NADP والعكس صحيح أيضاً.

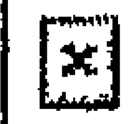
يوضح الجدول (1-6) بعض التفاعلات المحفزة بالأنزيمات المتطلبة للتميمات +NAD أو +NADP.

جدول (1-6) التفاعلات الأنزيمية المتطلبة للتميمات +NAD أو +NADP

التميم الأنزيمي	الناتج	الركيزة	الأنزيم
NAD+	Acetalehyde	Ethano	Alcohol dehydrogenase
NAD+ NADP+	Ketoglutarate+ CO_2	lsocitrate	Lsoctric dehydrogenase
NAD+	Dihydroxyacetone phosphate	Sn- Glycerol -3-phosphate	Glycerolphosphate dehydrogenase
NAD+	pyruvate	lactate	Lactic dehydrogenase
NADP+	Pyruvate + CO_2	l- Malate	Malic enzyme
NAD+	1.3-Diphosphoglyeric acid	Glyceraldehyde. 3 phosphate+ H_3PO_4	Glyceraldehyde3 phosphate dehydrogenase
NADP+	-6 phosphogluoconic acid	Glucose6-phosphate	Glucose 6 phosphate dehydrogenase

التميم الأنزيمي	الناتج	الركيزة	الأنزيم
NAD+ NADP+	Ketoglutarate + NH_3 acid	LGlutamic acid	Glutamic dehydrosenase
NADPH	Reduced glutathione	Oxidized glutathione	Glutathione reductase
NADH. NADPH	Hydroquinone	p-Benzoquione	Quinone redctase
NADH	Nitrite	Nitrate	Nitrate reductase

تظهر الانزيمات التي تحتاج إلى المركب +NAD أو +NADP في عملها، عدة اساليب عمل مشتركة. تحفز مزيلات الهدروجين Dehydrogenases المتطلبة للمركب +NAD أو +NADP أكسدة الكحولات. (الاولية والثانوية) والالدهيدات والأحماض الكربوكسيلية- الحاوية على مجاميع هدروكسيل في الموقع الفا أو بيتا — والأحماض الامينية الفا. ويمكن انعكاس هذه التفاعلات بسهولة وهذا يعني بأن نيوكليوتيدات النكوتين اميد تستطيع تقبل الالكترونات مباشرة من الركيزة المختزلة ووهبها مباشرة إلى الركيزة المؤكسدة في تفاعل مزدود وهكذا يمكن ربط تفاعل اختزال الاسيتالدهيد إلى الايثانول بواسطة الخميرة (بوجود الأنزيم Alcohol dehydrogenase بتفاعل أكسدة الكلسرالدهيد-3- فسفات (بوجود الأنزيم Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogensase) ويحصل تفاعل مزدوج مشابه في أنسجة الحيوانات تتحول فيه البيروفات إلى اللاكتات:



يمنع النياسين الإصابة بمرض البلاغرا الذي يتجلى في الجلد والجهاز الهضمي والعصبي، ويجب تناول ما لايقل عن 8.8 ملغم حامض النكوتنك لكل 1000 سعرة من الغذاء لتجنب النقص الغذائي للفيتامين.

يوجد حامض النكوتنك بصورة مرتبطة في الحبوب وخاصة الذرة ولا يمكن استغلاله من قبل الجسم إلا بعد استخلاصه إذ انه مرتبط بعديد الببتيد وثابت تجاه الحوامض (ولكنه غير مستقر تجاه القواعد) بحيث لا تستطيع انزيمات الجهاز الهضمي أن تشطره عن الببتيد وبهذا لا يمكن الانتفاع منه.

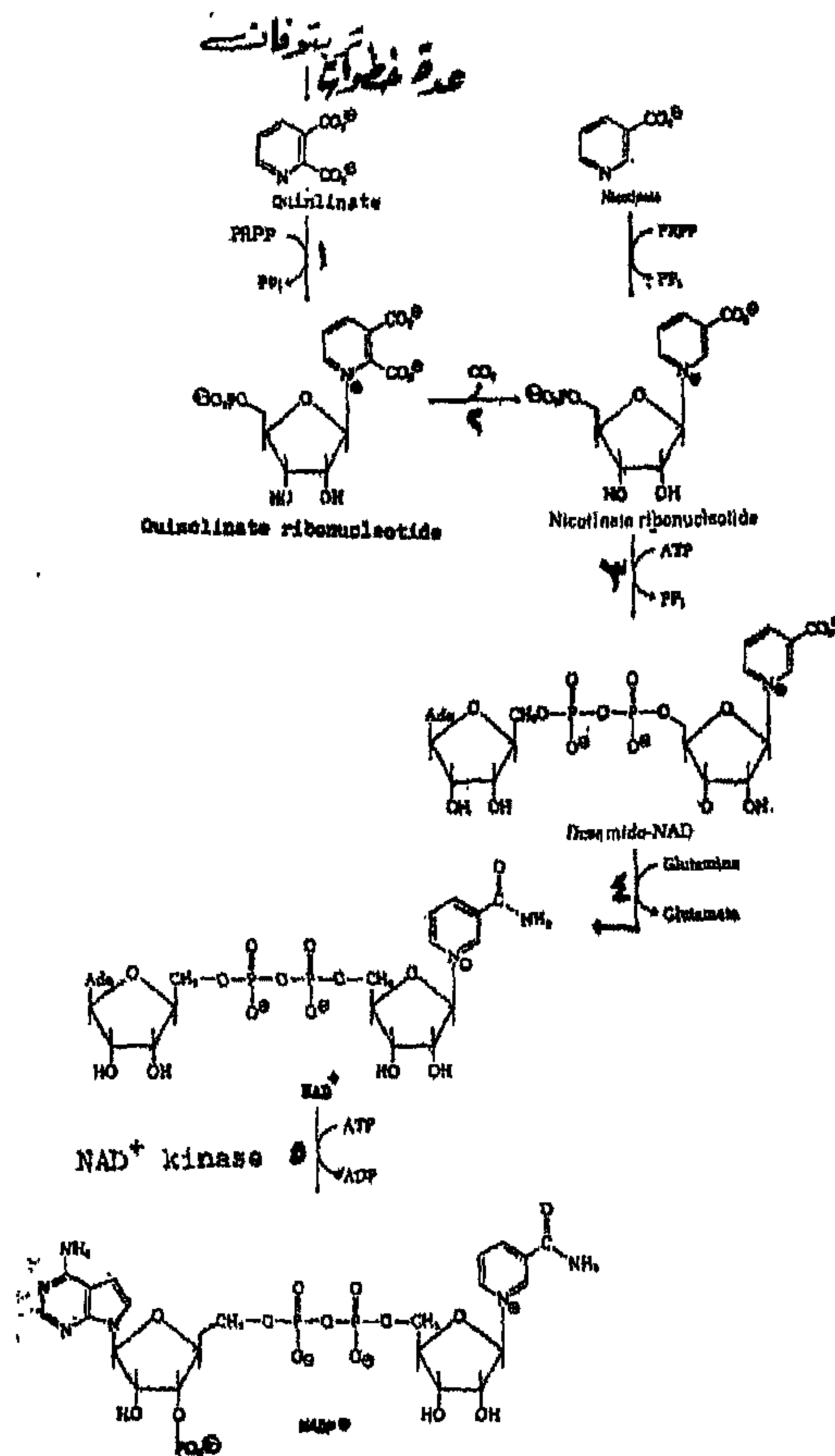
إن حامض النكوتنك مستقر جداً. وعند سلق الأغذية يفقد منه حوالي 15٪ فقط. ومن الجدير بالذكر إن جسم الإنسان يتمكن من تحويل الحامضي الأميني تريتوفان إلى النياسين وبناء على ذلك فإن مرض البلاكرا الذي يعد مؤشراً لنقص النياسين؛ يعد أيضاً مؤشراً لنوعية البروتينات المجهزة للإنسان.

1-4-3-2 التخليق الحيوي

يستطيع جسم الإنسان تخليق جزء من النياسين الذي يحتاجه من الحامض الأميني تريتوفان (شكل 1-9). يتحول التريوفان أولاً Quinolinate بعدة خطوات ثم يتحول الأخير إلى نيوكليوتيد الكوينولنات Quinolinate ribonucleotide (تفاعل 1) الذي يفقد CO_2 ليتحول إلى Nicontinate ribonuclotide (تفاعل 2)،

يرتبط الأخير بوحدة ادنيلات Adenylate مصدرها ATP لتكوين +NAD - Desmido (تفاعل 3)، وعند انتقال مجموعة أميد مصدرها الكلوتامين إلى مجموعة الكربوكسيل للنكوتنات يتكون الـ +NAD (تفاعل 4) يتحول الـ+NAD إلى +NADP بفسفرته في الموقع 2 لوحة الادنيلات لـل +NAD (شكل 1-9) بفعل الأنزيم NAD+ kinase (تفاعل 5).

إضافة إلى ماذكر، تشير الأدلة العملية إلى وجود نظام لتخليق +NAD في المايتوكدندريا ابتداء من النكوتناميد وليس من نيوكليوتيد النكوتنات.



شكل 1-9 تخليق التميمين الأنزيميين NAD^+ و $NADP^+$

من الحامض الأميني تربتوفال

1-4-3-3 تعيين النياسين

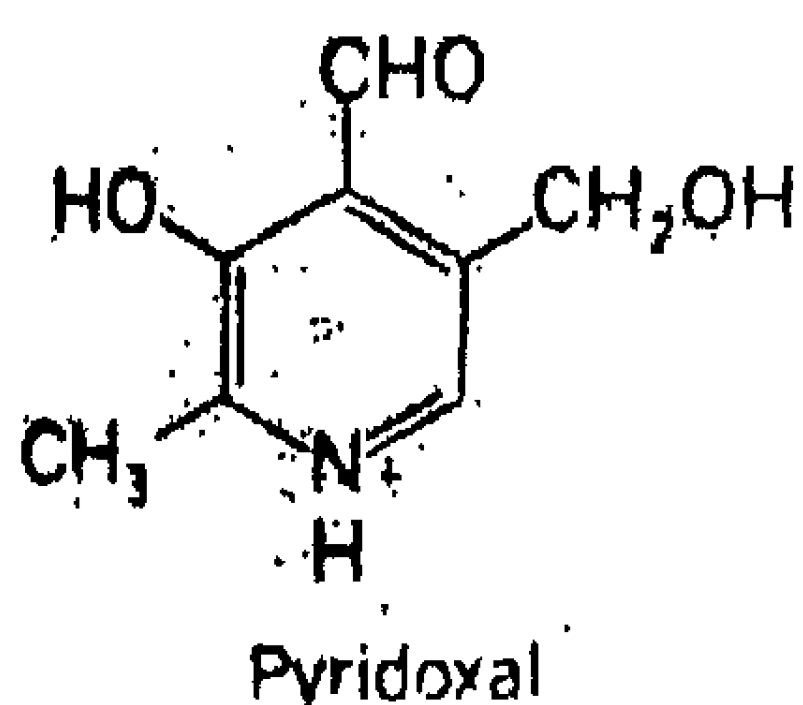
يمكن تعيين حامض النكوتنك أو أميده باختبارات الحيوانات أو الاختبارات الحيوية المجهرية (بواسطة Lactobacilus arabinosus) ولهذا الغرض يجب أولاً تحرير حامض النكوتنك أو أميد حامض النكوتنك من مشتقاتهما باستخدام القاعدة مثلا.

تعتمد الطرق الكيماوية المستخدمة لتعيين حامض النكوتنك والنكوتين اميد على تفاعل KONIGS pyridine (مشتق البريدين) مع بروميد السيانوجين أو كلوريد السيانوجين وامين ارروماتي.

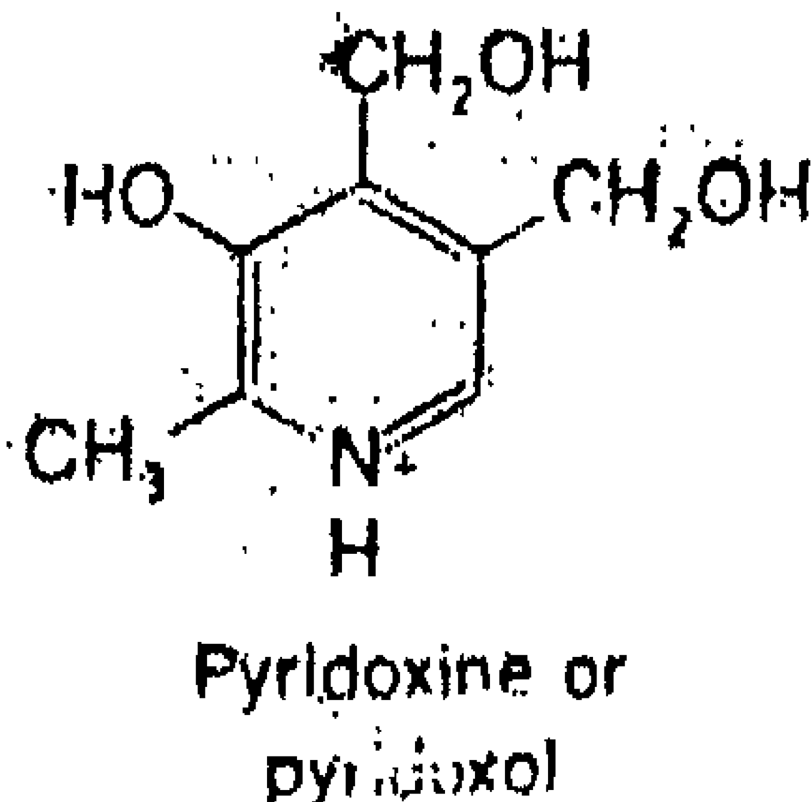
تتحطم حلقة البريدين بهذا التفاعل، وينتج عن تفاعل مشتق البريدين مع السيانوجين مركبا يتفاعل بدوره مع الامين الاروماتي لتكوين صباغ البولي ميثاين (polymethine) الصفراء.

1-4-4 مجموعة فيتامين B_6 (بريدوكسين)

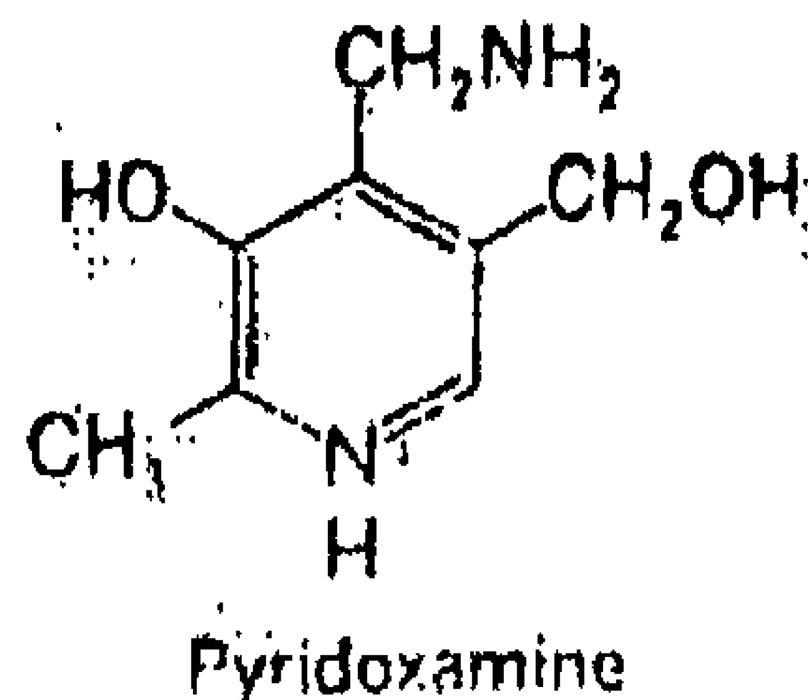
تعطى التسمية بريدوكسين- في نظام التسمية العالمية. إلى ثلاثة مركبات وثيقة الصلة ببعضها وهي pyridoxol وpyridoxal وpyridoxamine . توجد هذه المركبات سوية في المملكة النباتية وأما في المملكة الحيوانية فيوجد البريدوكسال والبريدوكسامين في الأغذية الحاوية على فيتامين B_6: الحليب وصفار البيض والخميرة والحبوب والخضروات الخضراء.



Pyridoxal



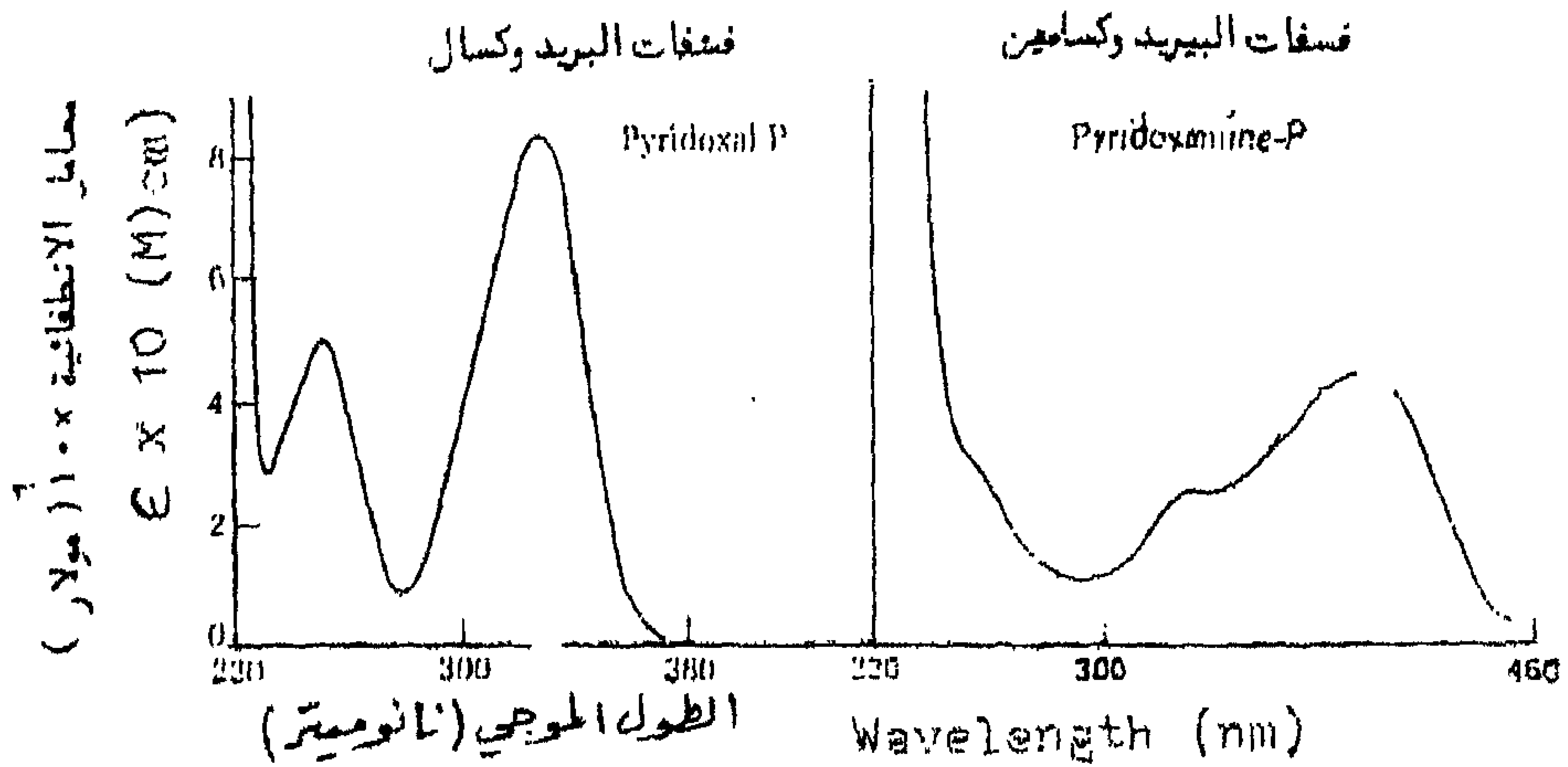
Pyridoxine or pyridoxol



Pyridoxamine

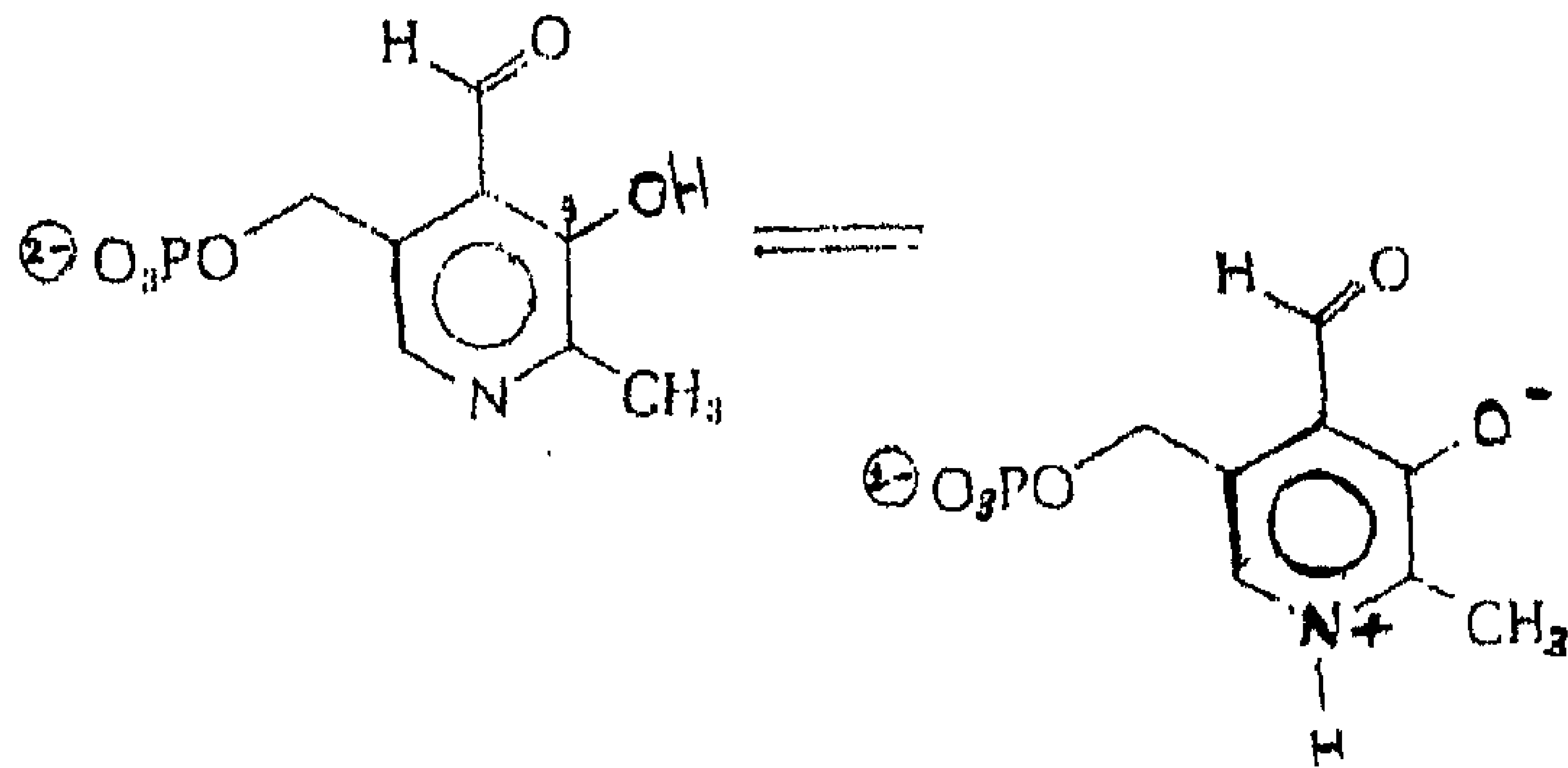
إن الصيغة الاعتيادية التجارية لفيتامين B_6 هي البريدوكسول pyridoxol الذي يتحول بسهولة في الحي In Vivo إلى بريدوكسال لسهولة أكسدة كحولات البنزلك Benzylic alachols.

تمثل فسفات البريدوكسال pyridozal phosphate الصيغة الفعالة للفيتامين وتنتج عن فسفرة مجموعة الهيدروكسيل المعرضة في الموقع5. يوضح الشكل (1-10) طيف الامتصاص لفسفات البريدوكسال وفسفات البريدوكسامين.



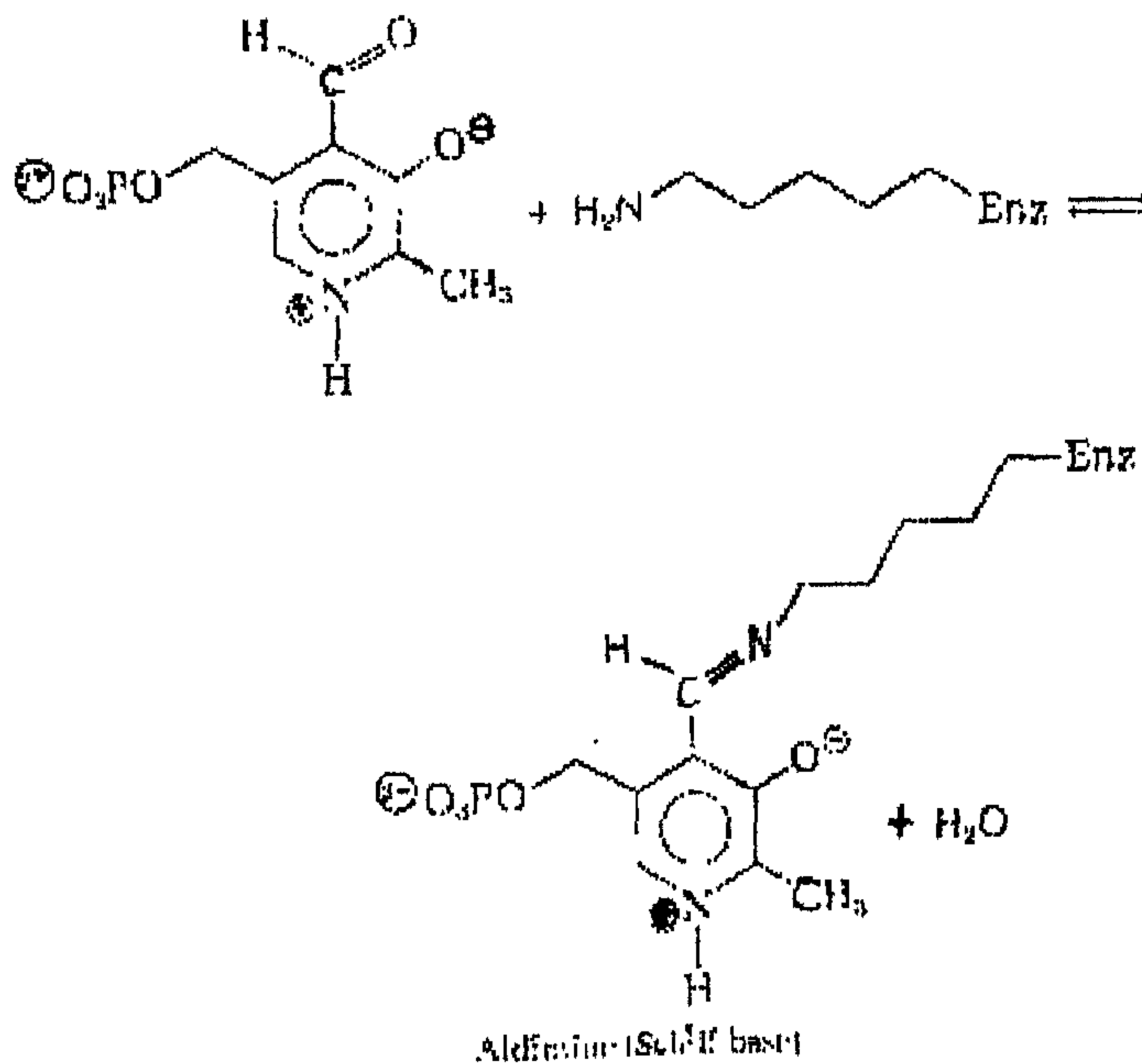
شكل 1-10 طيف الامتصاص لفسفات البرويدوكسال وفسفات البريدوكسامين في المنطقة فوق البنفسجية

تكون فسفات البريدوكسال بصيغة ايون ثنائي القطبية في الرقم الهيدروجيني 7.0 حيث تكون مجموعات الهدروكسيل في الموقع 3 متأينة فيما تكون نتروجين حلقة البريدين مبرتنة protonated (انظر المعادلة 1-16).



(16 -1)

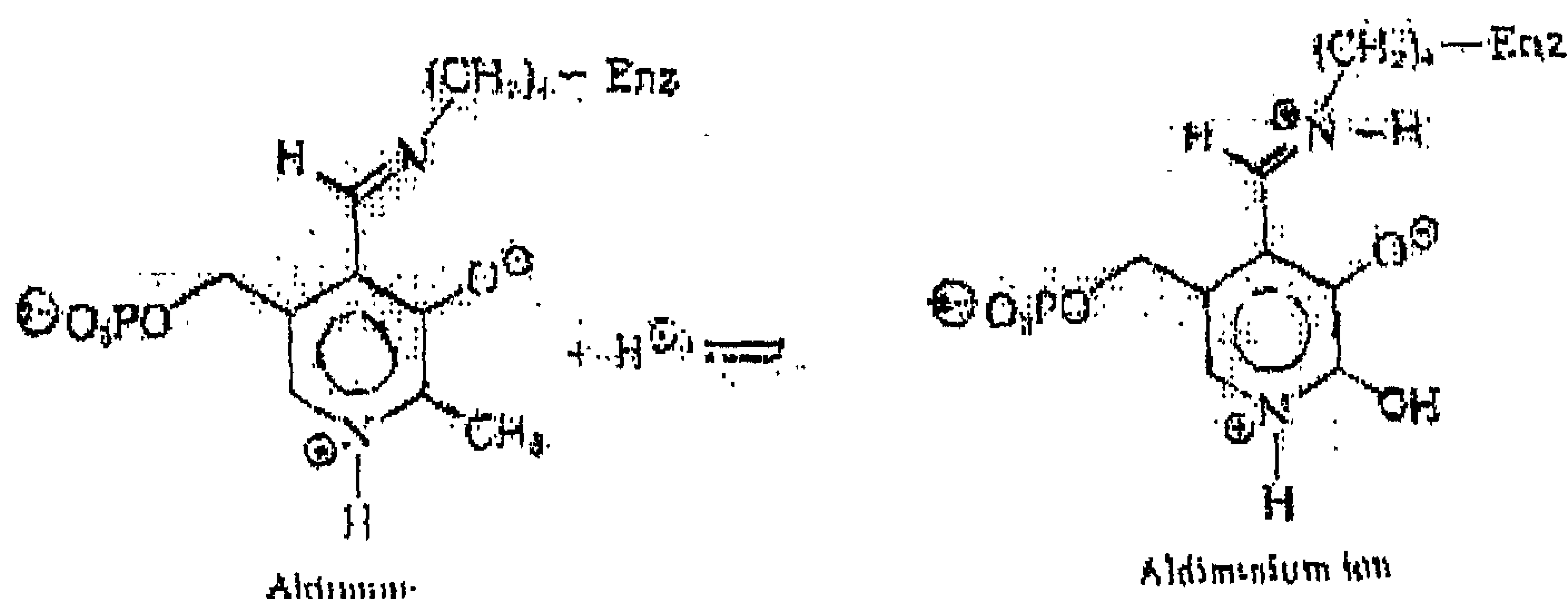
تكمن آلية عمل فسفات البريدوكسال بمثابة تميم أنزيمي بتفاعل الكربون الكربونيلي شحيح الالكترونات مع مجموعة امينو لثمالة اللايسين في الموقع النشط للأنزيم لإعطاء قاعدة Schiff أي Aldimine بين الأنزيم وفسفات البريدوكسال.



(17-1) الدمين (قاعدة شف)

إن نتروجين الامين قاعدية ، وفي الرقم الهيدروجيني 7.0 تحصل حالة موازنة بين الالدامين Aldimine وايون الإلدامنيوم المبرتن protonated aldimimium ion الذي تثبت شحنته الموجبة بذرة الأوكسجين سالبة الشحنة في الموقع 3 لحلقة البريدين.

يعمل أيون البريدينيوم موجب الشحنة سوية مع نتروجين الامين موجب الشحنة بمثابة حوض الكتروني في التفاعلات المحفزة بفسفات البريدوكسال. تثبت حلقة فسفات البريدوكسال الاروماتية. الكاربأنيونات Carbanions من خلال النظام II الساحب للالكترونات.



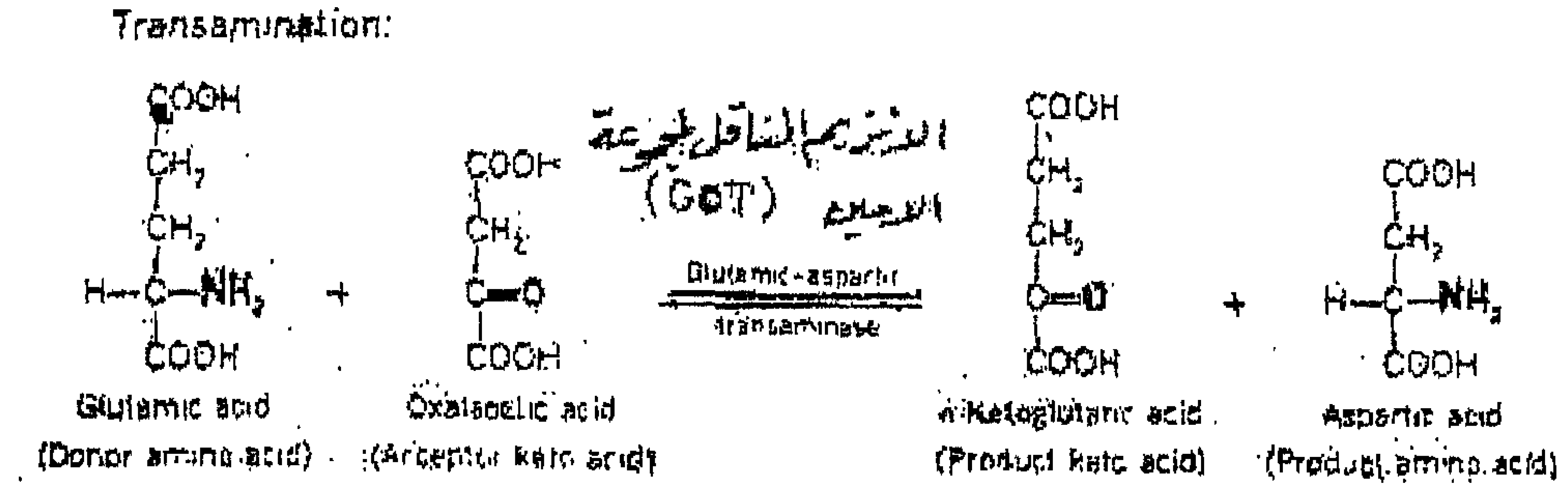
(18 -1)

1-4-4-1 التفاعلات الانزيمية المحفزة بفسفات البريدوكسال

يوجد التميم الانزيمي فسفات البريدوكسال بصورة رئيسة في الأنزيمات المحفزة لبعض التفاعلات الأيضية للأحماض الأمينية وكمثال الأنزيمات للكريوكسيل من الأحماض الأمينية Amino acid decarboxlases وناقلات مجموعة الامين Aminotransf erases ورزيمات الأحماض الأمينية Amino acid racemases.

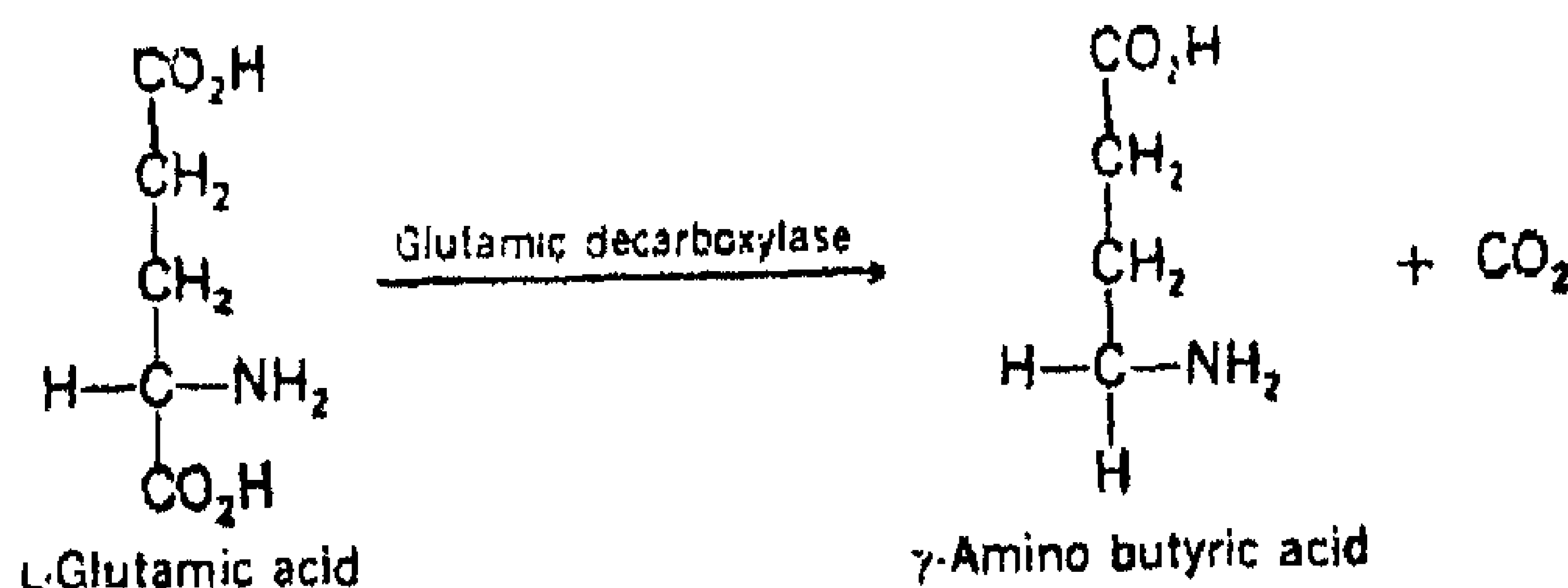
تساهم فسفات البريدوكسال في حول حامض اللنوليك إلى حامض الإراكدونك ويعتقد بأن قاعدة Schiff هي المركب الوسطي في التفاعلات المختلفة هذه بينما يسيطر صميم الأنزيم Apoenzyme على الناتج النهائي للتفاعل.

تمثل المعادلة (1-19) عملية نقل مجموعة الأمين من حامض اميني إلى حامض الفا- كيتو بوجود فسفات البريدوكسال والأنزيم الناقل لمجموعة الأمين وتمثل المعادلة (1-20)



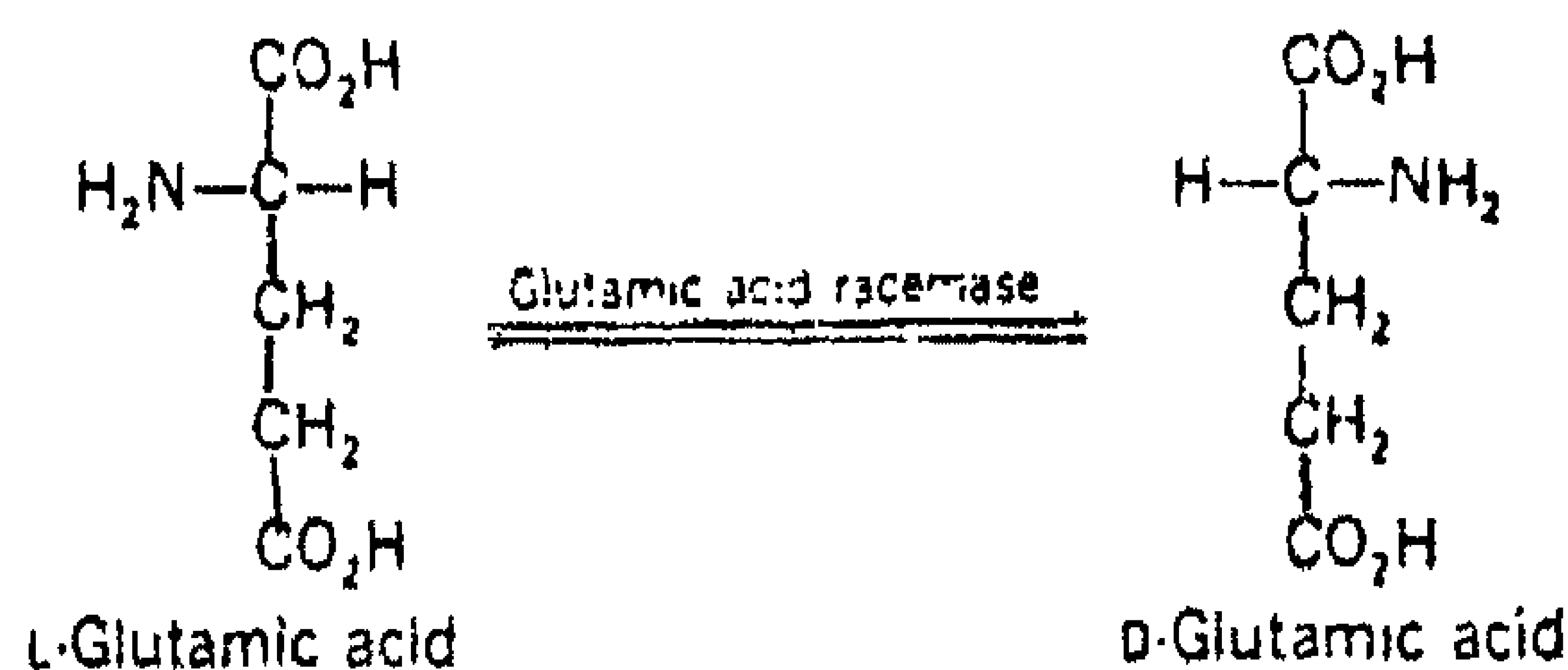
(19-1)

تفاعل إزالة مجموعة الكربوكسيل من الحامض الأميني كلوماتك. ويحصل هذا التفاعل في الدماغ حيث يثبط حامض كاما أمينو بيوترك نقل الإيعازات العصبية.



(20-1)

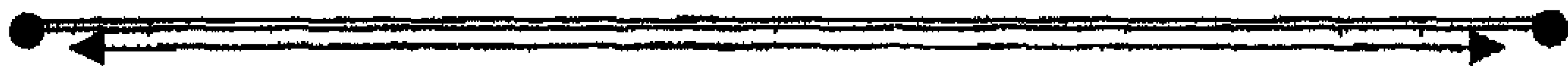
توضح المعادلة (1-21) التحول العكوس للحامض الاميني كلوتاميك بين الصيغتين DوL.



(21-1)

توضح المعادلة (1-21) التحول المعكوس للحامض الأميني كلوتاميك بين الصيغتين D و L.

ولتفصيل ميكانيكية هذه التفاعلات نشير إلى الشكل 1-11 فعند وجود الأنزيمات الناقلة لمجموعة الأمين Transaminases تحصل سلسلة التفاعلات (a) الموضحة في الشكل 11-1(). أما مزيلات الكربوكسيل الفا -Decarboxylases فتحصل سلسلة التفاعلات (b)، وتحدث سلسلة التفاعلات (c) عند توفر انزيمات Racemase نوعية (شكل 1-11).



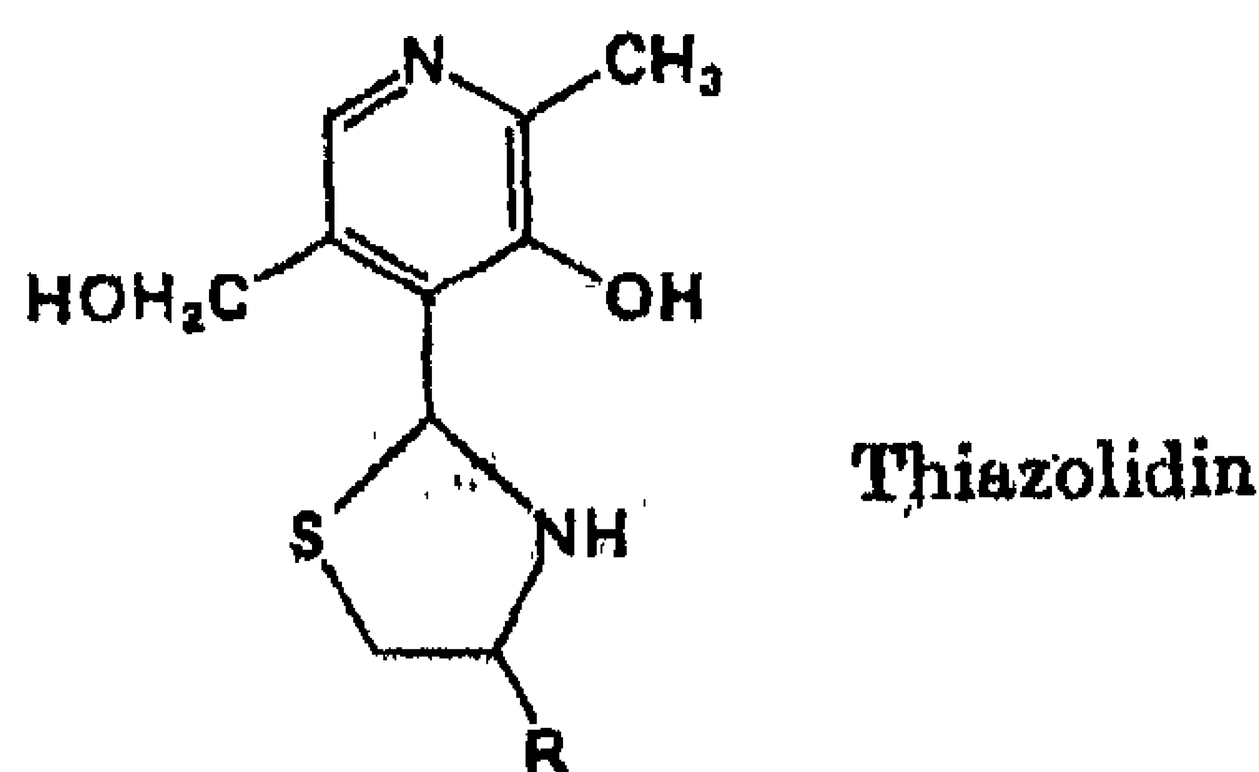
شكل 1-11 انماط التفاعلات المحفزة بالأنزيمات المستخدمة لفسفات البريدوكسال (نقل عن المصدر 7).

يحوى الأنـزي phosphorylase a ثمالـة فـسفات البريدوكـسال مرتبطـة بالأنزيم مـن خـلال المجموعة ايبسلون-امينو لثمالة لايسين. تؤدي معاملة الأنـزيم بمادة بوروهدريد الصوديوم ($NaBH_4$) إلى اختزال الأمين إلى الأمـين. أن الاختزال يؤدي إلى فقدان فعالية جميع الأنزيمات المعتمدة على فسفات البريدوكسال إلا الأنزيم phosphorylase.

ويحتمل أن يكون التميم الأنزيمي فسفات البريدوكسال جوهريا للحفاظ على هيئة فعالة للأنزيم، ويعتقد بأن الفعالية التحفيزية للتميم فسفات البيريدوكسال- أن وجدت- قد تتعلق بجموعة الفسفات التي يمكن أن تعمل بمثابة محفز قاعدي، فهي مدفونة في المنطقة الهدروفوبية للأنزيم على بعد حوالي 0.7 نانوميتر من الموقع النشط. يحفـز الأنـزيم phosphorylase نكـوص Degradation الكلايكـوجين وتكـوين كلوكوز 1- فسفات في خطوات متتالية حتى يتكون ما يسمى limit dextrin.

1-4-4-2 فيتامين B_6 والتغذية

يحتاج الإنسان في غذائه إلى 2-3 ملغم فيتامين B_6 في اليوم الواحد وغالباً ما تتوافر هذه الكمية في الغذاء الاعتيادي وقد تزداد حاجة الجسم للفيتامين كما في حالة المرض أو زيادة سرعة التفاعلات الأيضية أو عند زيادة تناول البروتينات.



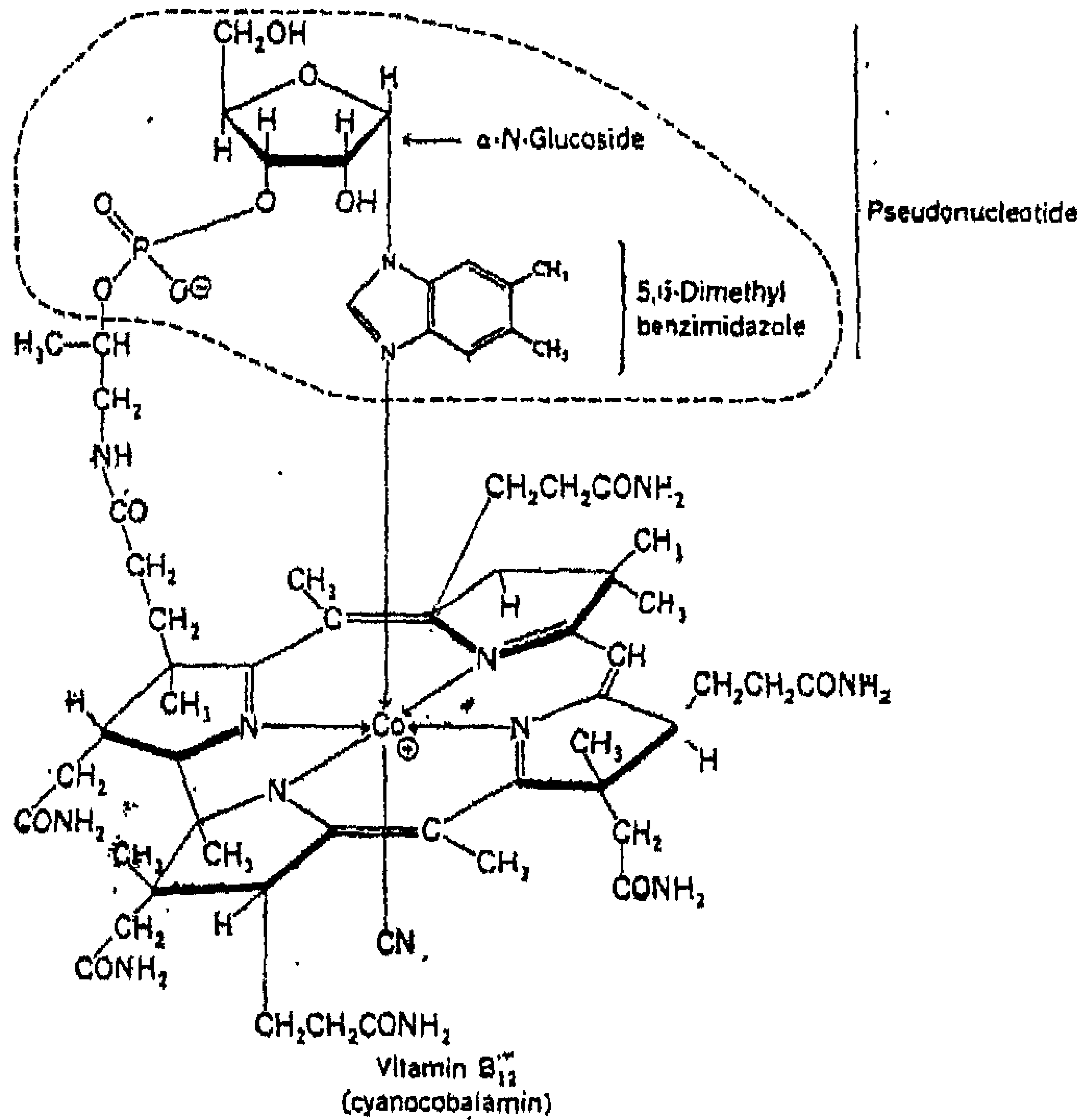
إن أكثر صيغ الفيتامين استقراراً هو البريدوكسال ولهذا يستخدم في تدعيم الأغذية. يفقد 45٪ من فيتامين B_6 في اللحم المطبوخ و 20-30٪ في الخضراوات المطبوخة، وعند تعقيم الحليب، يتفاعل الفيتامين مع الحامض الأميني Cysteine

لتكوين المركب غير الفعال Thiazolidin الذي يعد السبب لفقدان فعالية هذا الفيتامين في بقية الأغذية.

يؤدي نقص فيتامين B_6 إلى نمط معين من التهاب الجلد وإلى اضطرابات عصبية وفي الحيوانات الفتية ، يؤدي نقص الفيتامين إلى اختلال في النمو وتلف الغدد التكاثرية وتغيرات في الكلى.

1-4-5 مجموعة فيتامين B_{12} (كوبالامين)

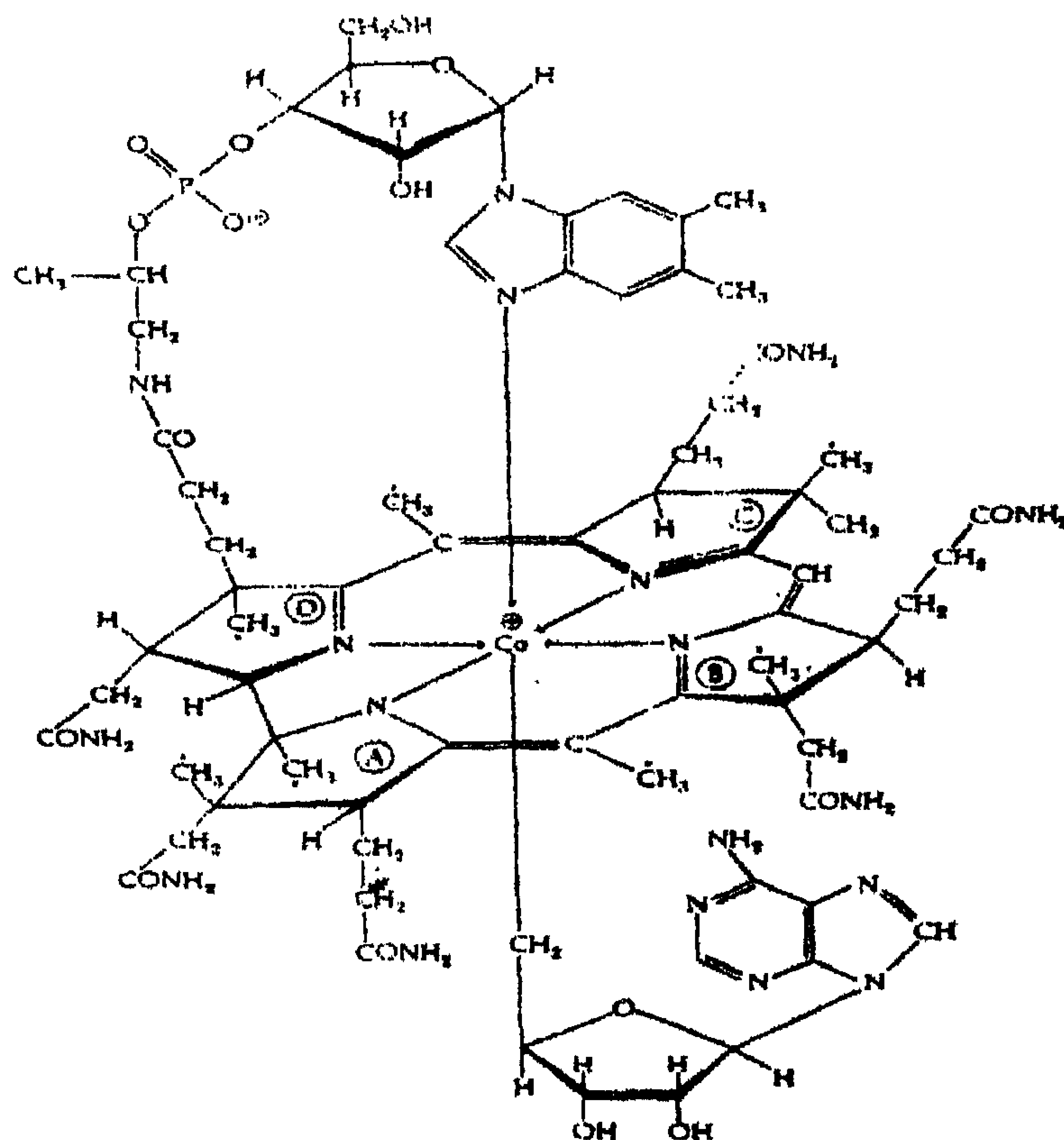
أهم مركبات هذه المجموعة فيتامين B_{12} اوسيانكوبالامين. تحتوي هذه الجزيئة المعقدة على تركيب يشبه حلقة البورفرين التي نجدها في تركيب الهيموغلوبين أو الكلوروفيل إلا أن التركيب الحلقي لفيتامين B_{12} يرتبط تساهمياً بأيون كوبلت ثلاثي التكافؤ.



Vitamin B_{12}
(cyanocobalamin)

1-4-5-1 وجوده

يوجد فيتامين B_{12} في الحيوانات والأحياء المجهرية بصيغة تميم أنزيمي يسمى تميم الأنزيم B_{12}، ويختلف عن فيتامين B_{12} بعدم وجود مجموعة السيانو وإرتباط أيون الكوبلت مباشرة بذرة الكربون رقم 5 لثمالة الريبوز المرتبطة بالادنين. إن هذا الإرتباط الفلزي العضوي مثير للاهتمام ذلك لأن مجموعة المثلين تشكل المركز الفعال في هذا التميم الأنزيمي (شكل 1-12). لا تحتوي النباتات فيتامين B_{12}.



Coenzyme B_{12}:
cobamide coenzyme

شكل 1-12 تميم الأنزيم B_{12} (التميم الأنزيمي كوباميد)

التميم الأنزيم غير مستقر نسبياً ويتفكك بوجود الضوء أو السيانيد إلى

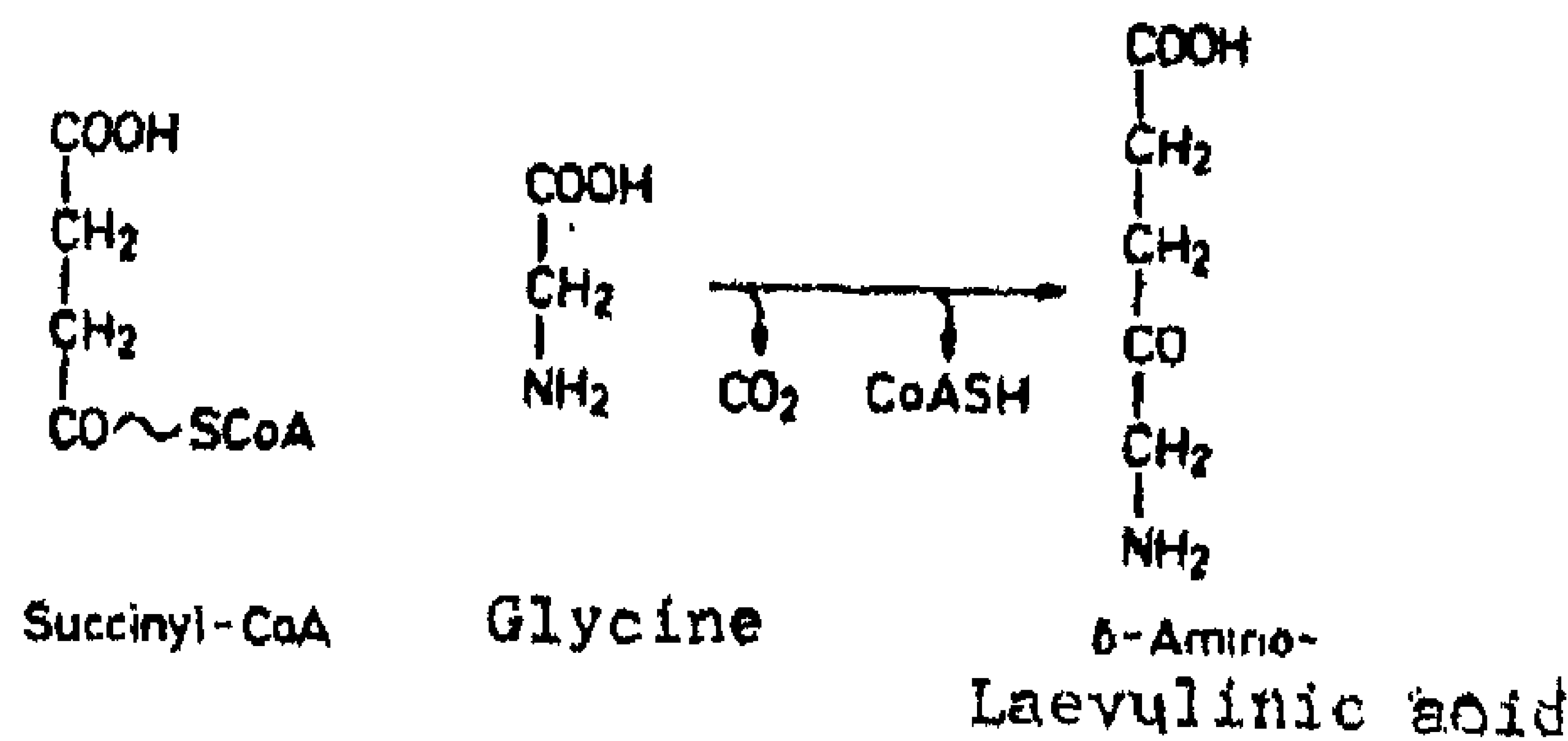
هدروكسي كوبالامين أو سيانو كوبالامين على التوالي ولهذا يعقتد بأن فيتامين B_{12} يوجد في الطبيعة بصورة رئيسية بشكل تميم الأنزيم.

يعتمد ثبات فيتامين B_{12} على عدة عوامل فهو مستقر في درجات حرارة عالية إذا وجد في الرقم الهيدروجيني 4-6. يفقد الفيتامين ثباته في الرقم الهيدروجيني القاعدي وعند وجود مواد مختزلة مثل حامض الاسكوربيك وSO_2

1-4-5-2 التخليق الحيوي لفيتامين B_{12}

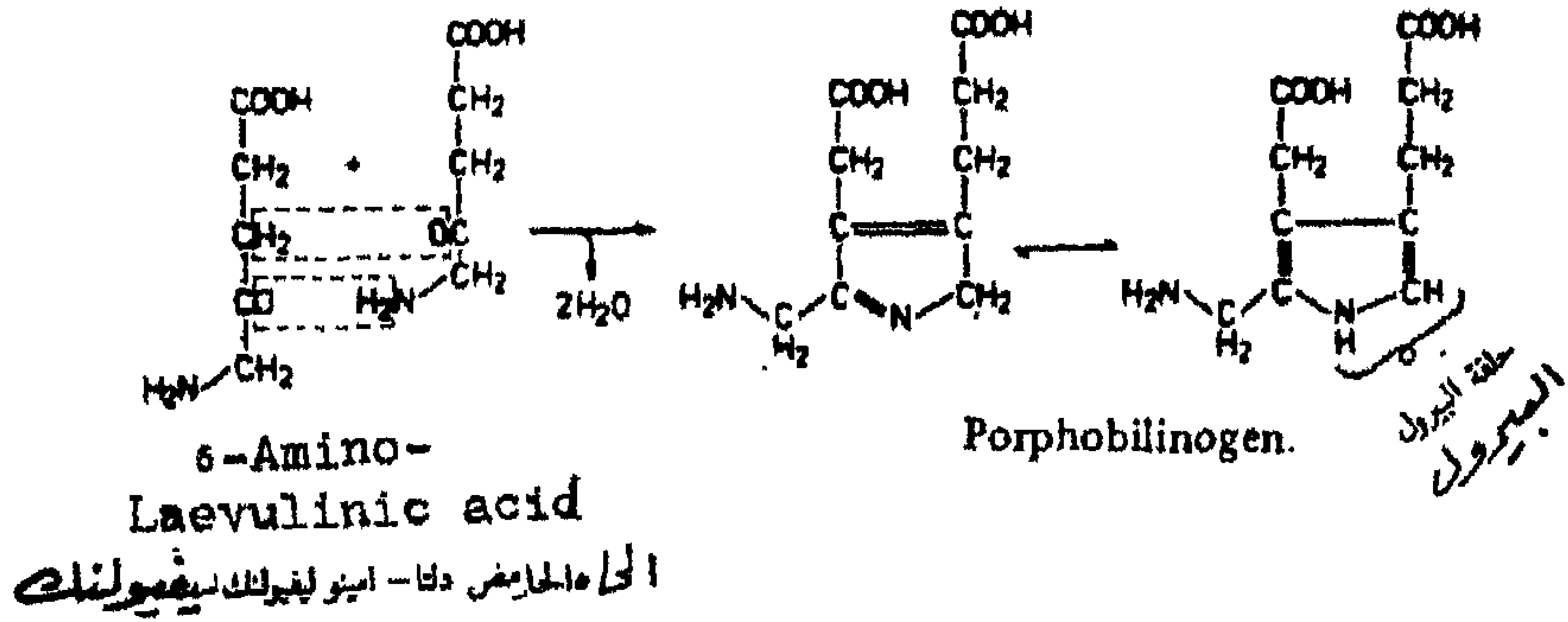
لا تستطيع الحيوانات الراقية أو النباتات الزهرية تخليق فيتامين B_{12} وتعد الكائنات المجهرية الموجودة في التربة أو الماء أو الأمعاء مصادر لهذا الفيتامين. تحتاج عدة كائنات مجهرية فيتامين B_{12} لنموها وبذلك تعد أساس الطريقة الحيوية المجهرية لتعيين الفيتامين.

تستطيع البكتريا الشبيهة بالعفن التي تنتمي إلى جنس Actinomy cetes مثل propionibacterium Shermanii أو Streptocomyces olivaceus تخليق فيتامين B_{12} وتبتديء العملية بتخليق حلقات الكورين Corrin من المركب سكسنيل- تميم الأنزيم A) (succinyl CoA) الذي ينتج بدوره في دورة kerbs للحامض ثلاثي الكربوكسيل (دورة حامض السترك). يتكاثف سكسنيل- تميم الأنزيم A (succinyl CoA) مع الكلايسين لتكوين الحامض دلتا- أمينو ليفيولنك -Aminolaevulinic acid ويتكاثف جزيئتين



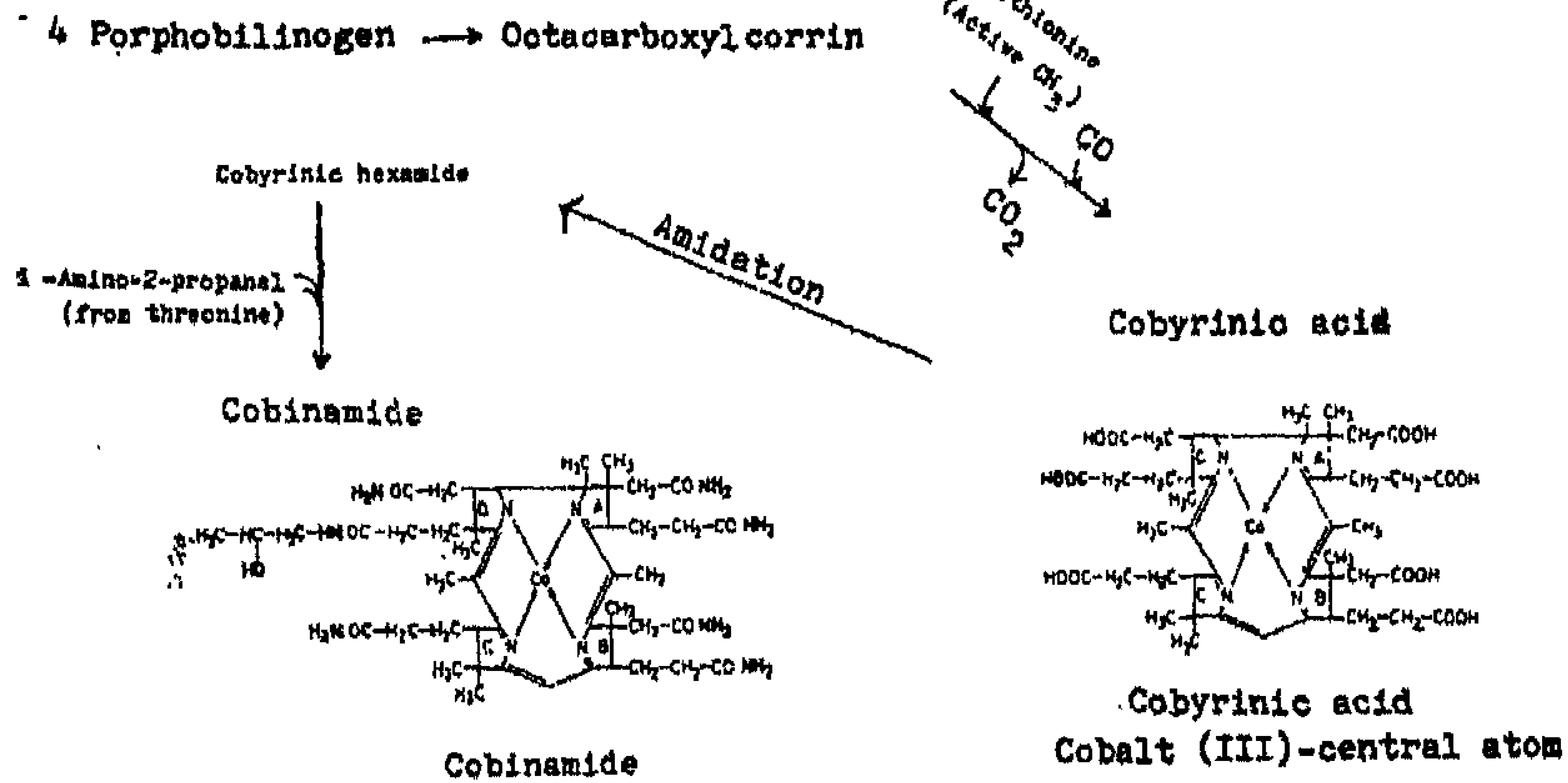
(22 -1)

من -aminolaeveulinic- يتكون المركب porphobilinogen وبذلك يتم تخليق حلقة البيرول pyrrol ring.

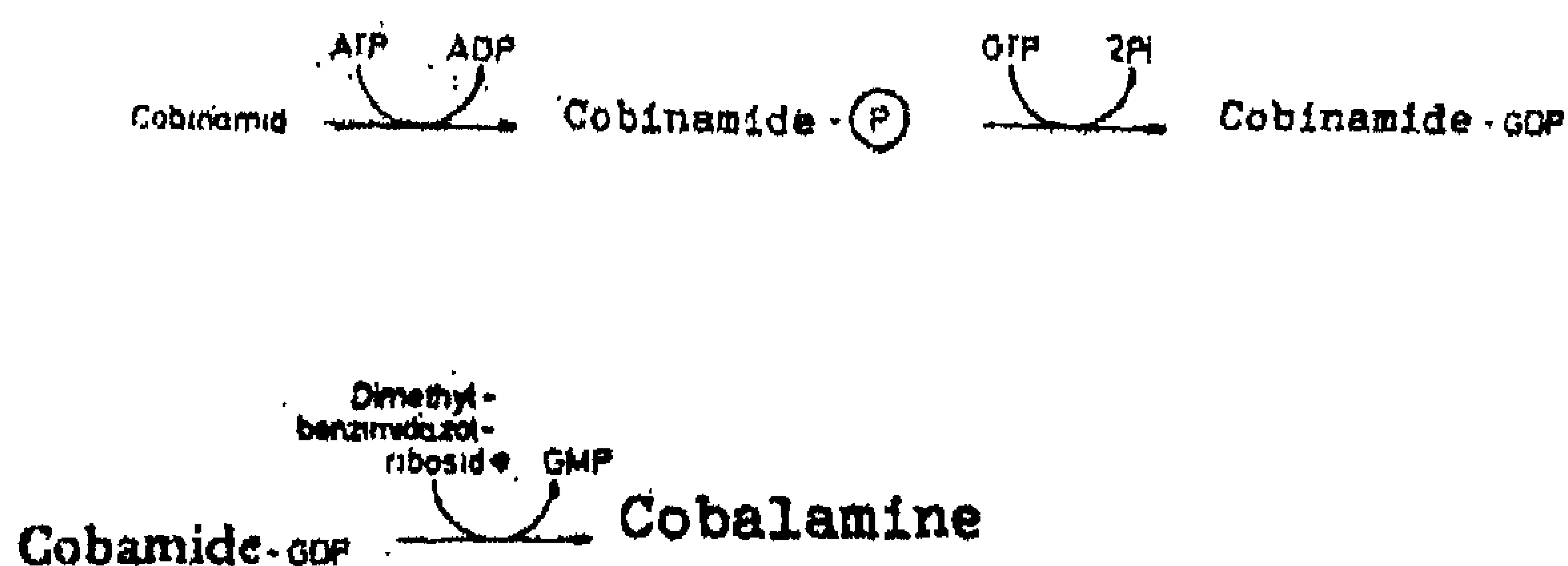


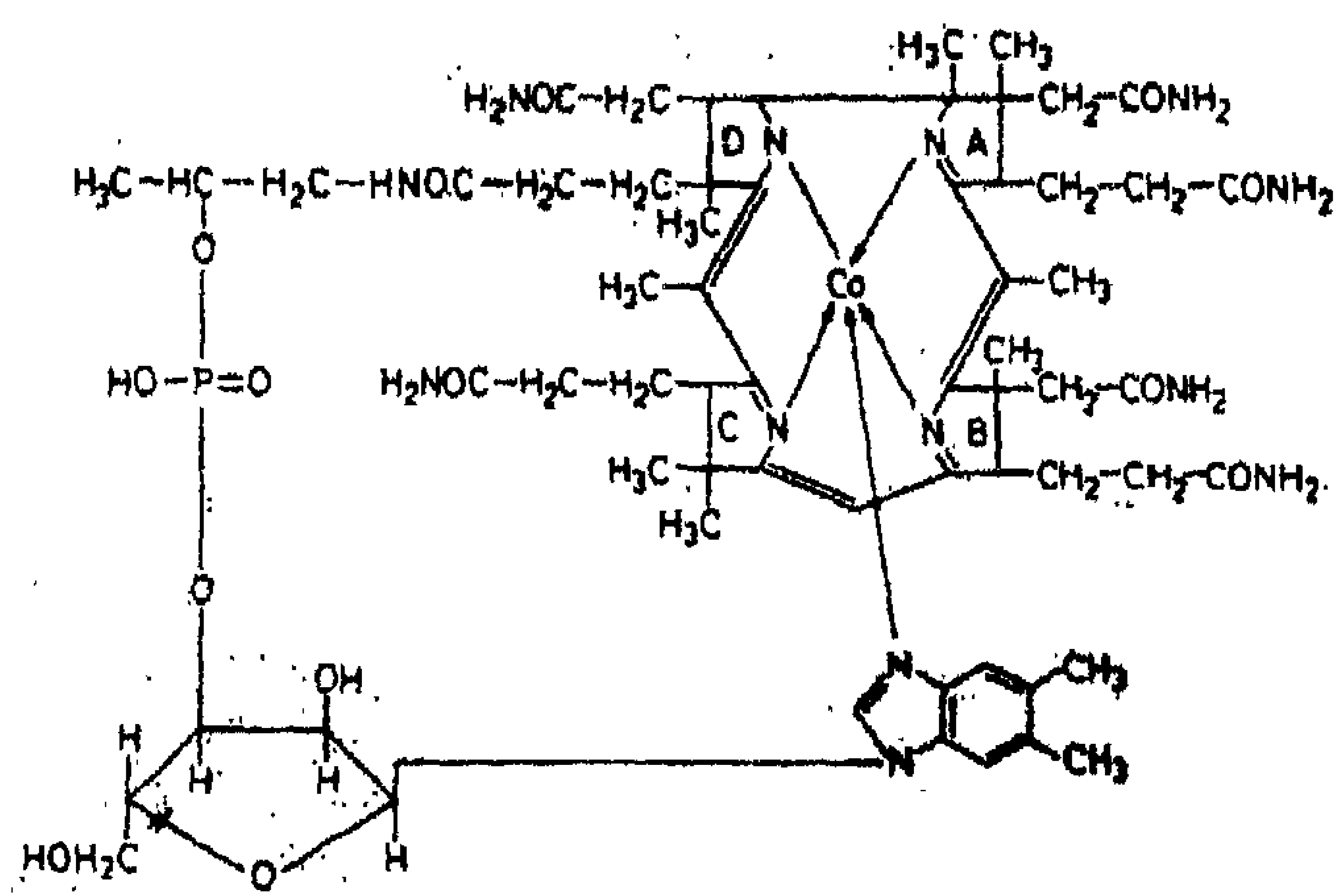
(22 -1)

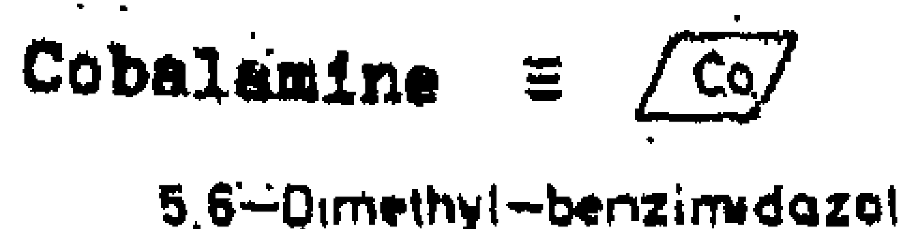
يتكون المركب Cobinamide يتكاثف أربع حلقات porphobilinogen ويعتقد بأن العملية تتم كالآتي:



يتم بعد ذلك فسفرة Cobinamide إلى Cobinamide phosphate ثم تنشيطه بريطه بثمالة GDP لتكوين Gobinamide- GDP ويتفاعل الأخير مع Dimethyl- benzimidazol riboside يتكون Cobalamine:







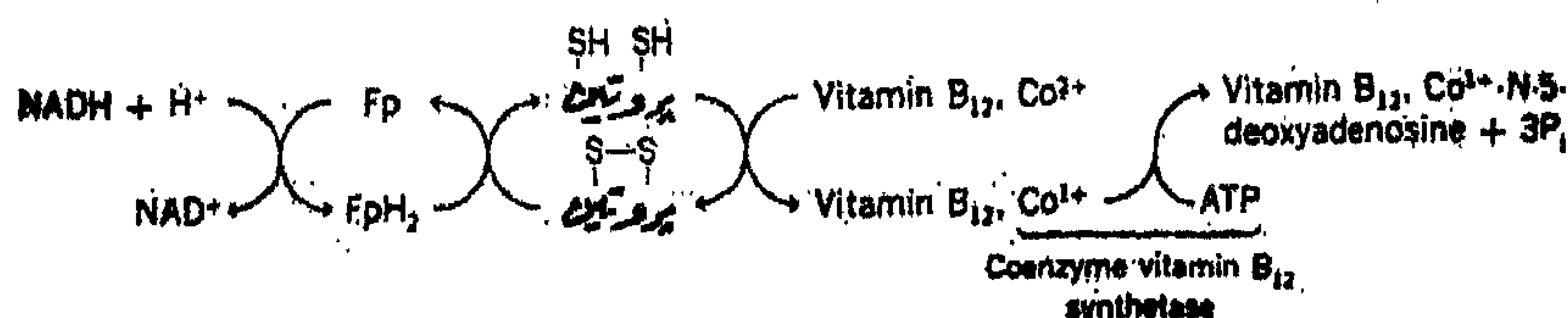
5,6—Dimethyl—benzimidazol

1-4-5-3 الوظيفة الكيميائية الحياتية

إن فيتامين B_{12} المتناول في الغذاء يرتبط في الجهاز الهظمي بمادة يفرزها الغشاء المخاطي للمعدة تسمى (العامل الجوهري) وتكوين هذه المادة جوهرياً لامتصاص فيتامين B_{12} من الأمعاء وبدونها لا يمكن امتصاص كميات كافية من الفيتامين.

يدخل فيتامين B_{12} في عدة تفاعلات حيوية في الكائنات العليا ومنها ما

يدخل في أيض الكربوهيدرات أو الأحماض الأمينية أو البروتينات. إن الحاجة لفيتامين B_{12} ضئيلة جداً وربما حوالي 1 ميكروغرام في اليوم ولهذا نادراً ما يحصل نقص في فيتامين B_{12} في الإنسان إلا عند النباتين ذلك لأن النباتات مصادر فقيرة به، وعند نقصان B_{12} يصاب الإنسان بفقر الدم الوبيل pernicious anemia يساهم فيتامين B_{12}- بشكل التميم الانزيمي كوباميد Cobamide Coenzyme في عدة تفاعلات حيوية ويمكن تخليقه من الفيتامين كما في التفاعل الآتي:



(25-1)

يحفز التفاعل أنزيم B_{12}Coenzyme Synthetase أن نظام الاختزال لهذا التفاعل معقد ويشتمل على فلافوبروتين يحوي NADH و ثنائي الكبريتيد – flavoprotein disulfide– NADH ينقل العامل المختزل NADH الكتروناته من خلال الفلافوبروتين إلى البروتين ثنائي الكبريتيد لتكوين بروتين الشايول SH.SH الذي يحول فيتامين CO_2+B_{12} ويصبح هذا الشكل المختزل ركيزة لتفاعل الالكلة مع المركب ATP>

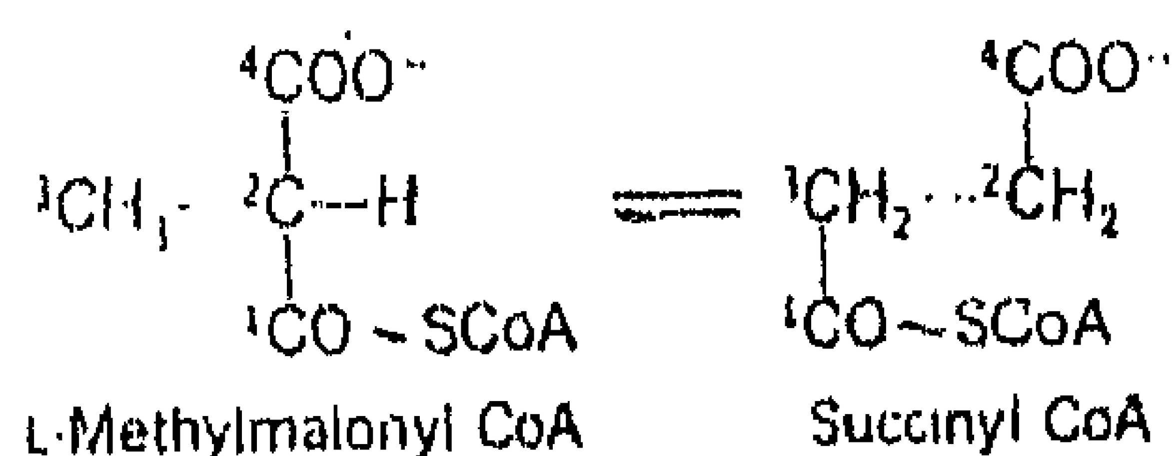
يسهم تميم الأنزيم B_{12} حوالي أحد عشر تفاعلاً مميزاً إضافة إلى تفاعلات يتم فيها اختزال المعقد CH_3– enzyme- Vitamin B 12 إلى ميثان أو كربكسلته لتكوين استات. ومن جميع هذه التفاعلات، لا يحصل في الحيوانات إلا ذلك المحفز بالأنزيم Methyl malonyl CoA mutase فيما تحصل جميعها في البكتريا حيث تم اكتشافها. ولم التعرف على تفاعل أنزيمي متطلب لفيتامين B_{12} في النباتات لحد الآن.

يمكن وضع تفاعلات تميم فيتامين B_{12} في أربعة أنظمة رئيسة:

أ- شطر آصرة C-C

مثال:

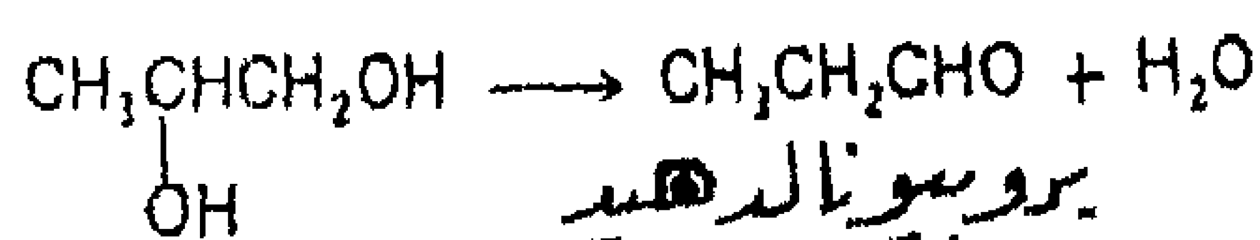
التفاعل المحفز بالأنزيم L- Methylmalonyl COA mutase وهو أحد الأنزيمات في مسلك أكسدة الأحماض الدهنية ذات العدد الفردي لذرات الكربون.



(26-1)

ب- شطر آصرة C-O

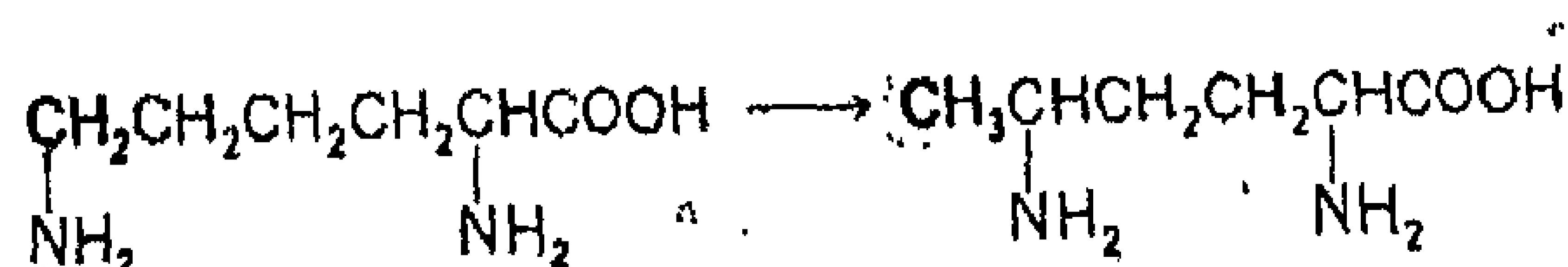
مثال: التفاعل المحفز بالأنزيم Diol dehydrase



(27-1)

ج- شطر آصرة C-N

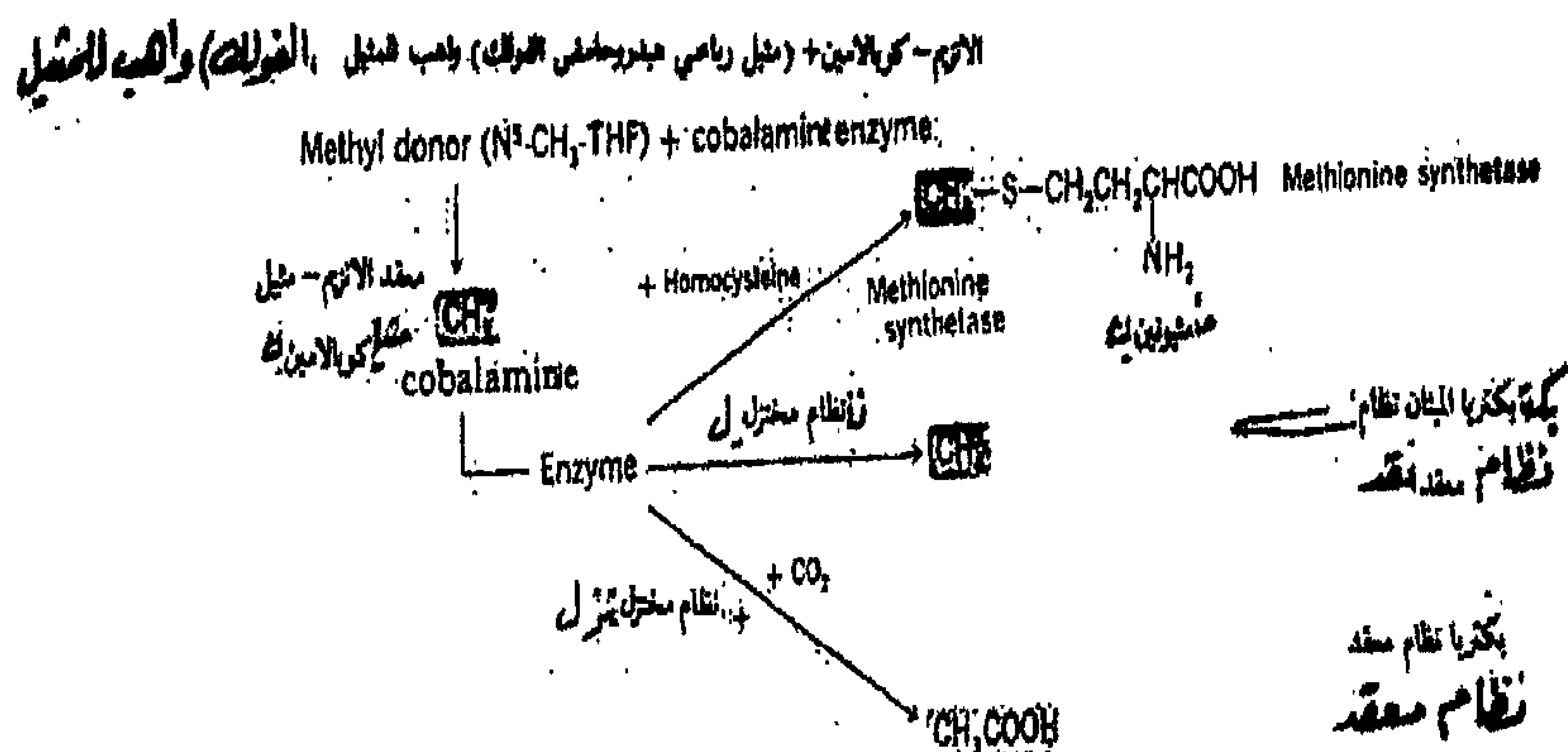
مثال: التفاعل المحفز بالأنزيم D- α - lysine mutase



لايسين

(28-1)

د- تنشيط المثيل



(1-29) بروبيونالدهيد لايسين

1-4-5-4 تعيين فيتامين B_{12}

تستخدم عادة الطرق الكيميائية والحياتية لتعيين فيتامين B_{12}. وفي بعض الأحيان لا تكون الطرق الكيميائية ناجحة إلا بعد تركيز الفيتامين وإزالة المواد المتداخلة وطريقة تعيينه.

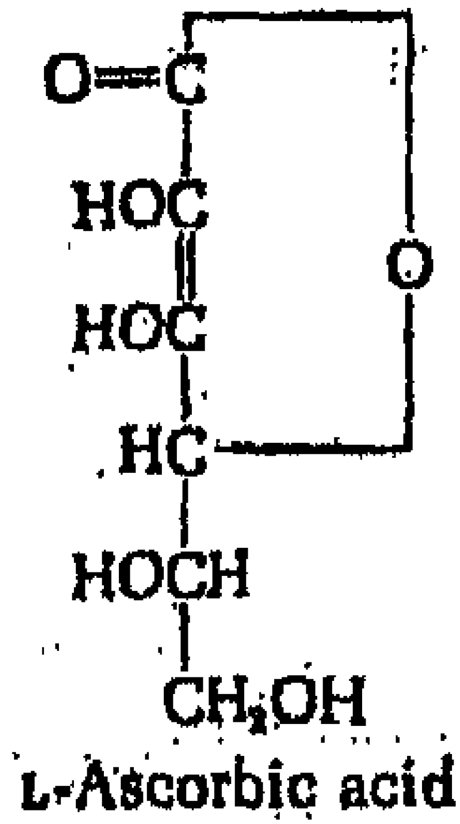
في الطرق الحديثة للتعيين، يستخدم فيتامين B_{12} الموسوم بالنظير المشع بمثابة معيار داخلي Internal standard. ثم يتم حساب كمية الفيتامين المفقودة من الغذاء من خلال قياس الفقدان في الفعالية الحيوية. إن الطرق الحيوية عادة شديدة الحساسية بحيث لا تحتاج إلى تركيز الفيتامين تمهيداً لتعيينه.

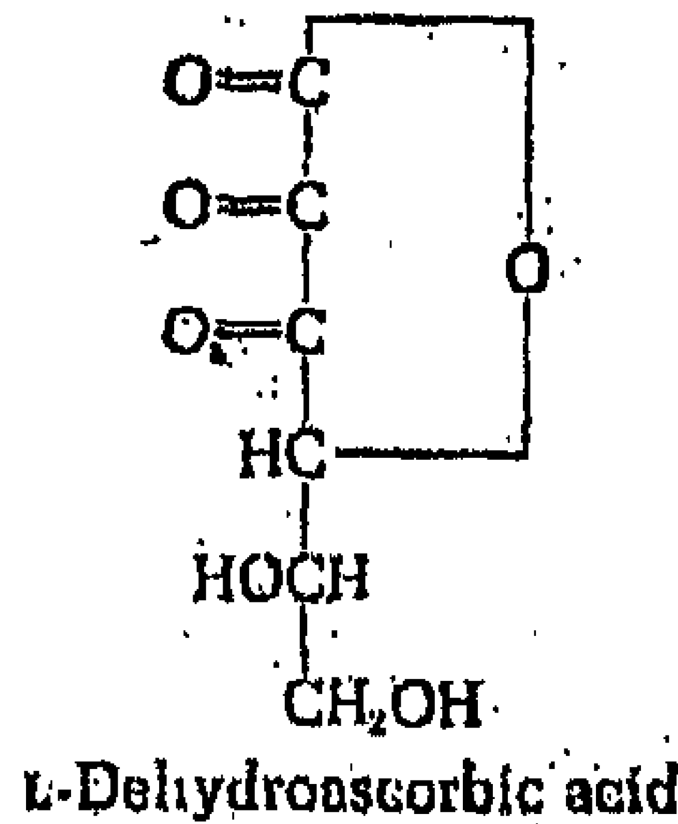
1-4-6 فيتامين C (حامض إل- أسكوربك L (+) Ascorbic acid)

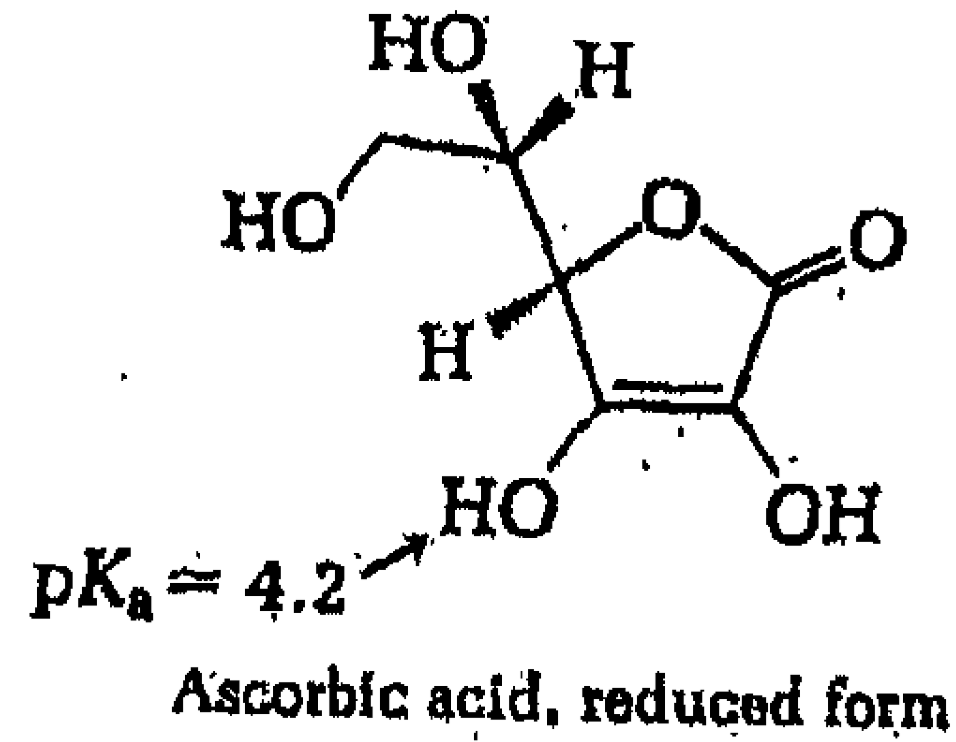
حامض إل-اسكوربك Lthreo-hexono-1.4- lactone- 2 ene مادة بلورية بيضاء (درجة انصهارها 192°م) فعالة ضوئياً (في الماء: {a} D= + 23°}).

تشكل الفواكة الطازجة والخضراوات مصادر غذائية مهمة له وبصورة

عامة تكون الخضراوات الورقية الخضراء غنيه به كما تحتوي على كميات كبيرة نسبياً من الفيتامين.

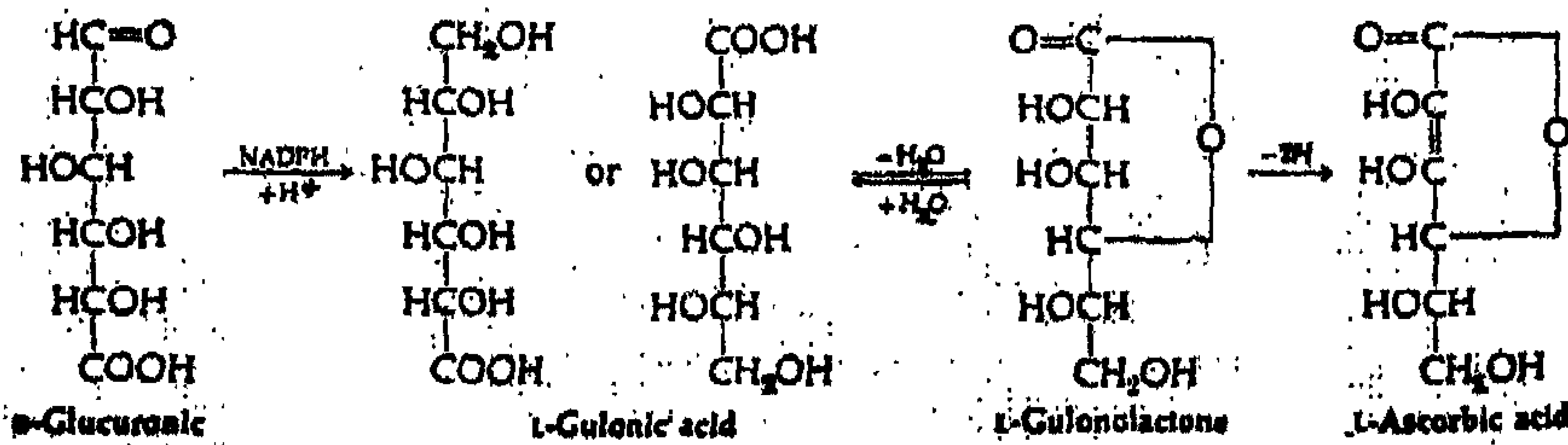






1-4-6-1 تخليق حامض إل- أسكوربك

حامض الاسكوريك جوهري للإنسان وللمقدمات Primates الأخرى. ولخنازير غينيا وللخنازير والأسماك وعدة طيور وبعض الحشرات إلا أنه يمكن تخليقه من قبل حيوانات أخرى. إن الخطوات الرئيسية في تخليق حامض الإسكوربك في الحيوانات كالآتي:

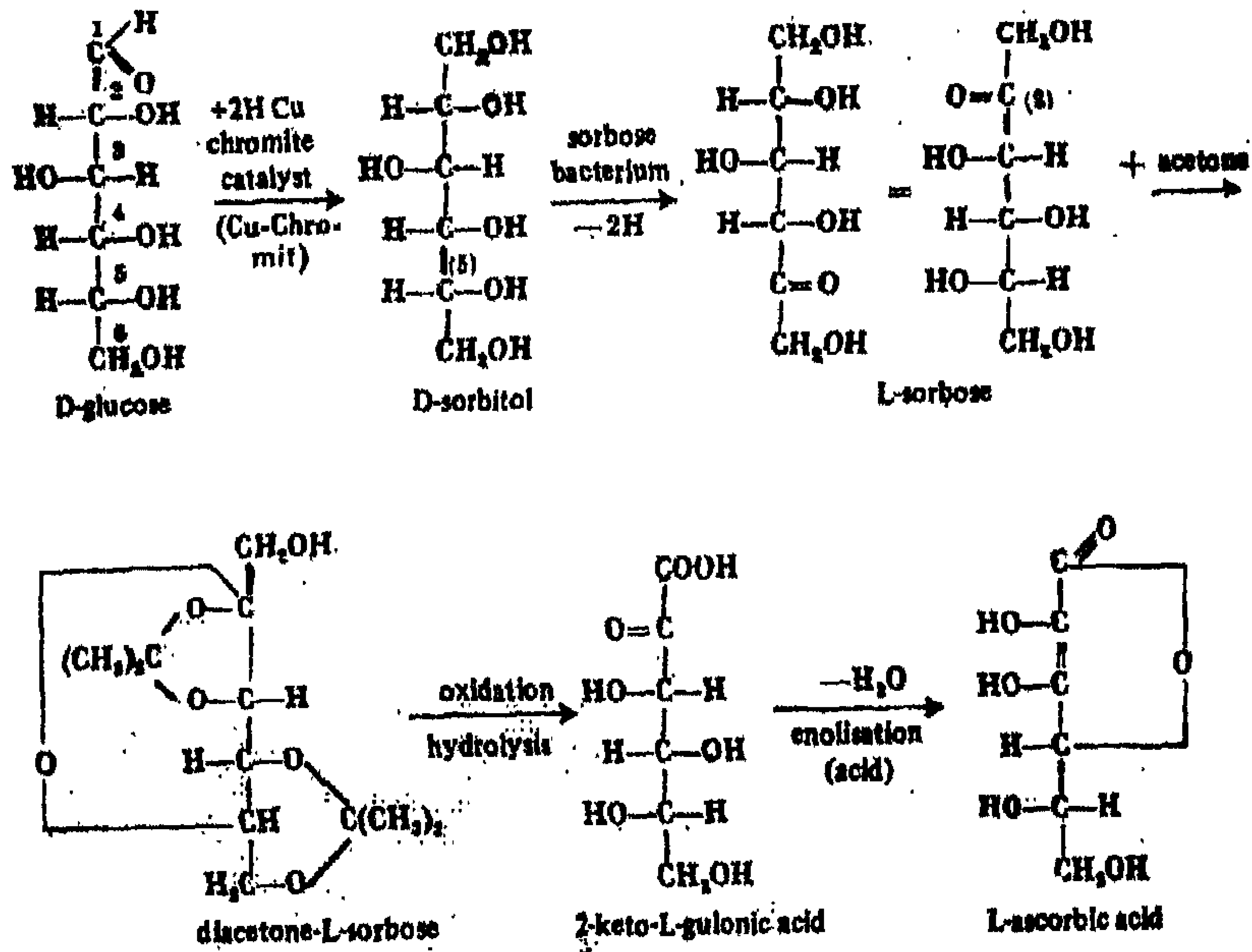


(13-1) الخطوات الرئيسية في تخليق حامض الاسكوربك ابتداء من حامض الكلوكيورونك

تفتقر المقدمات primates وخنازير غينيا إلى الأنزيم المرتبط بالتميم FAD والذي يحول Gluccnolactone إلى حامض الإسكوربك (شكل 1-13).

1-4-6-2 الإنتاج الصناعي لحامض الإسكوربك

يبتدي التركيب الصناعي لفيتامين C من الكلوكوز خلال D-Sorbitol ثم L- Sorbosc ثم 2– ketogulonic acid الذي يتحول مباشرة إلى حامض الإسكوربك (شكل 1-14).



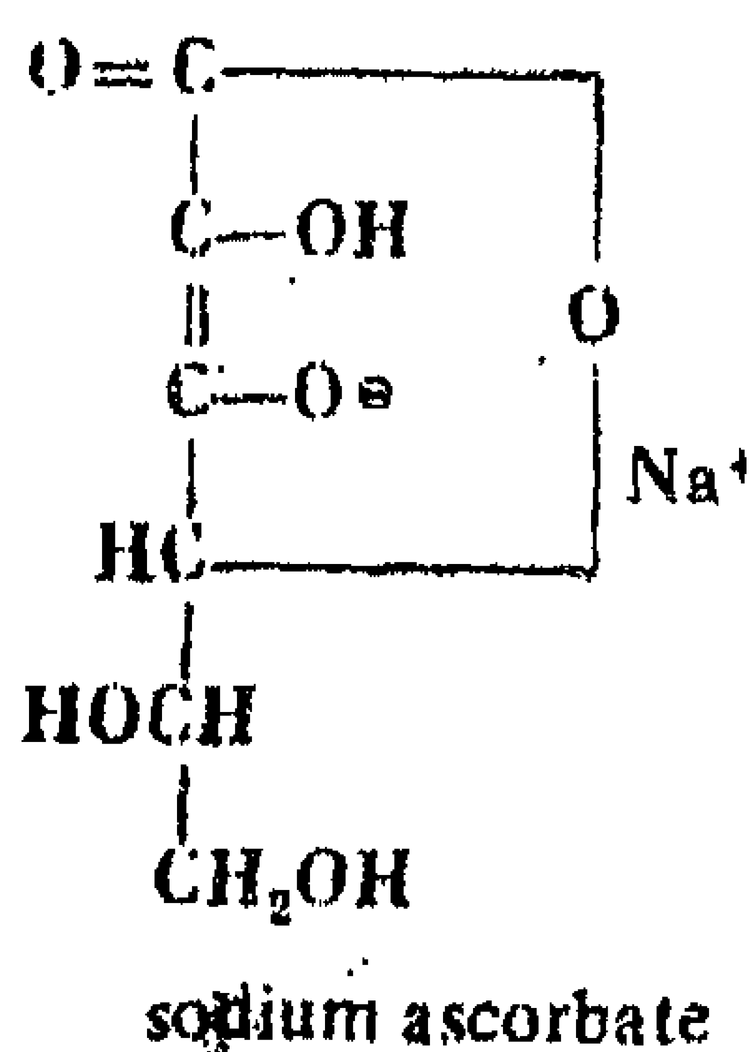
شكل 1-14 التركيب الصناعي لفيتامين C L-ascorbic acid

ابتداء من الكلوكوز

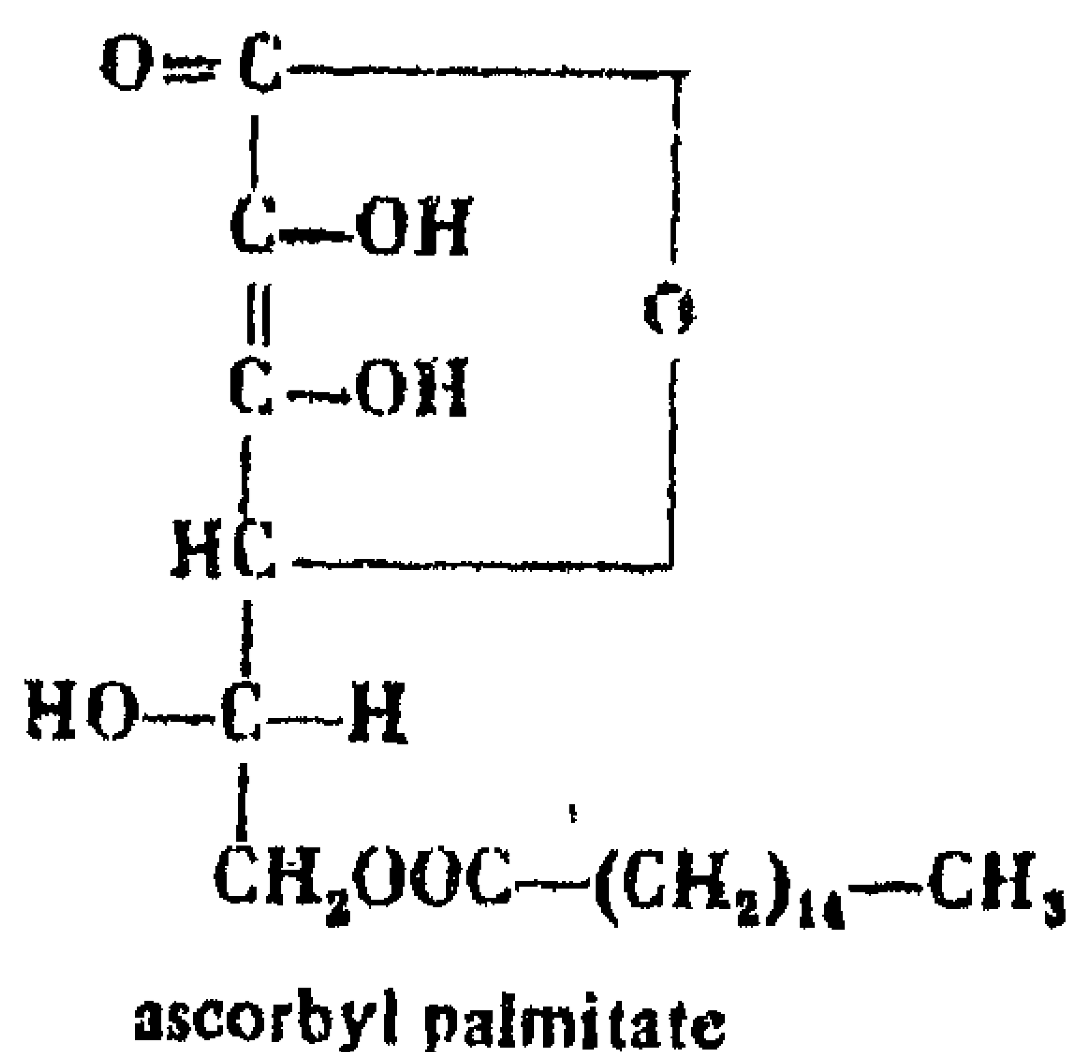
تؤدي هدرجة الكلوكوز إلى تكوين D-Sorbitol. يتم تحول D-Sorbitol إلى L -Sorbose باستخدام البكتريا Acetobacter التي تؤدي إلى أكسدة مجموعة OH مجاورة إلى مجموعة OH مشابهة لها في شاكلتها Configuration وهذا ما نجده عند ذرات الكربون 5.4 للسوربتول. إن خصوصية الأكسدة هذه جعلت الطريقة مستخدمة لتوضيح شاكلة السكريات المختلفة.

تتم خطوة الأكسدة التالية L-Sorbose-2-keto-L- gulonic مباشرة بالأوكسجين بوجود البلاتنيوم أو خلال مشتق ثنائي الاستون باستخدام برمنكنات البوتاسيوم. يؤدي التحلل المائي بوجود الحامض إلى شطر ثمالة Residue استون. يتحول الحامض keto-L- gulonic-2 إلى صيغة الاينول ثم اللاكتون لتكوين حامض الإسكوربيك (شكل 1-14).

يمكن استرة مجاميع OH الكحولية لحامض الإسكوربيك مع الأحماض الدهنية لتكوين مثلا Ascorbyl palmitate القابلة للذوبان في الدهون وبذلك تستخدم مضادا للأكسدة في الصناعات الغذائية.



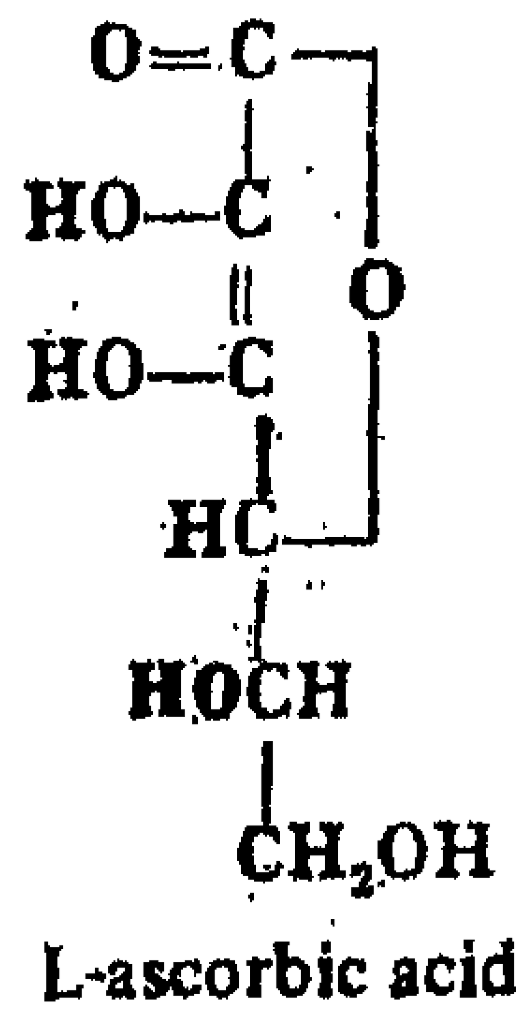
sodium ascorbate



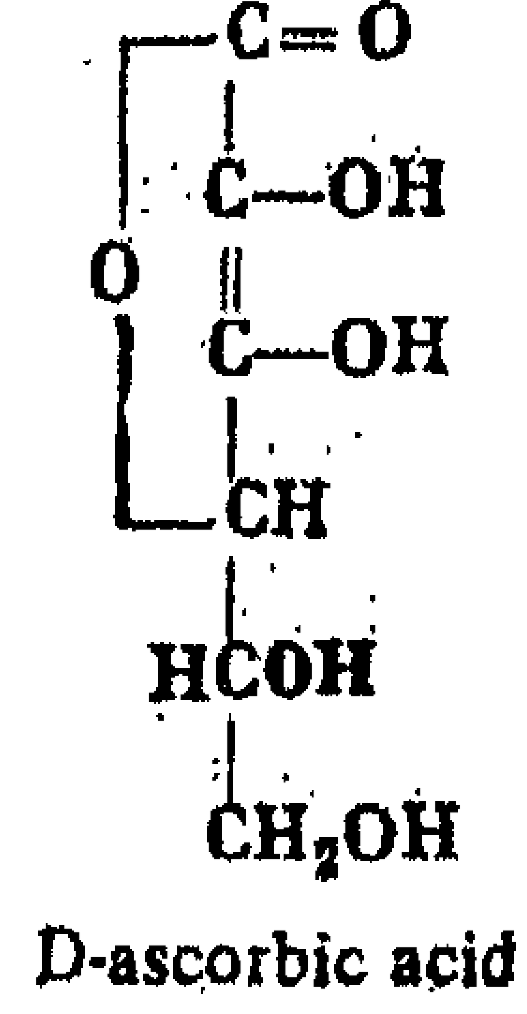
ascorbyl palmitate

كما وأن الحامض D-Isoascorbic يمثل واحدا من أربعة ايزومرات فراغية (شكل 1-15) لحامض الإسكوربيك وهو مضاد للأكسدة مهم وقابل للذوبان في الماء.

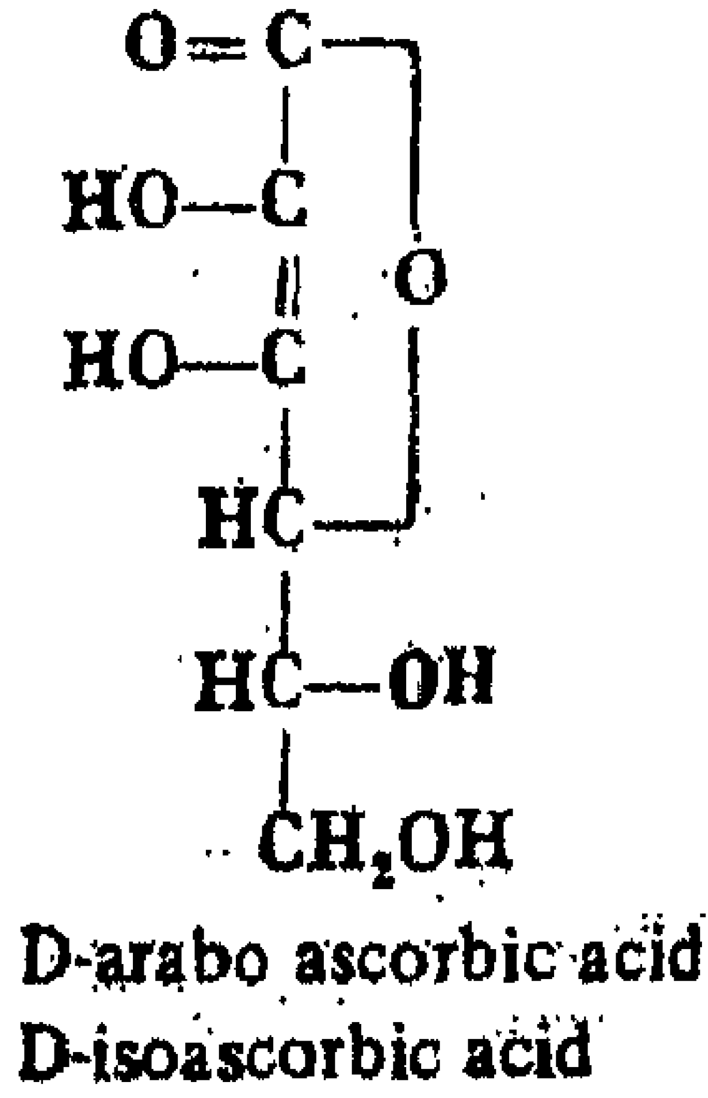
يمكن تحضير حامض D-Isoascorbic صناعيا بالتخمر الهوائي للكلوكوز وبواسطة بعض أنواع الـ penicillium بنسبة 40٪ للسكر المستخدم.



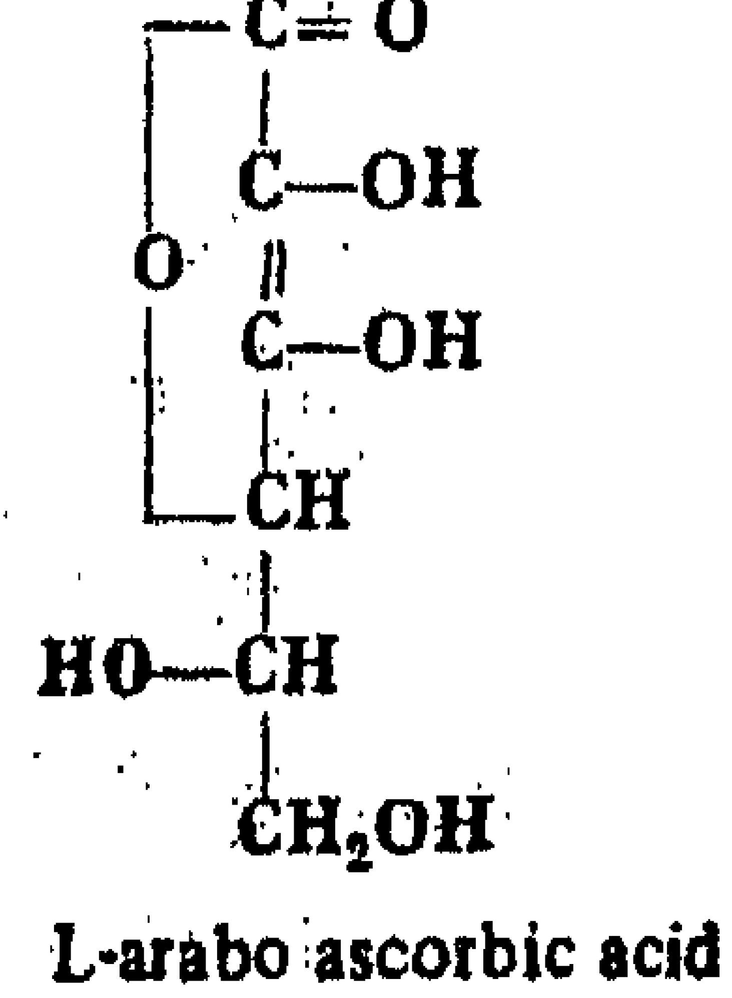
L-ascorbic acid



D-ascorbic acid



D-arabo ascorbic acid
D-isoascorbic acid



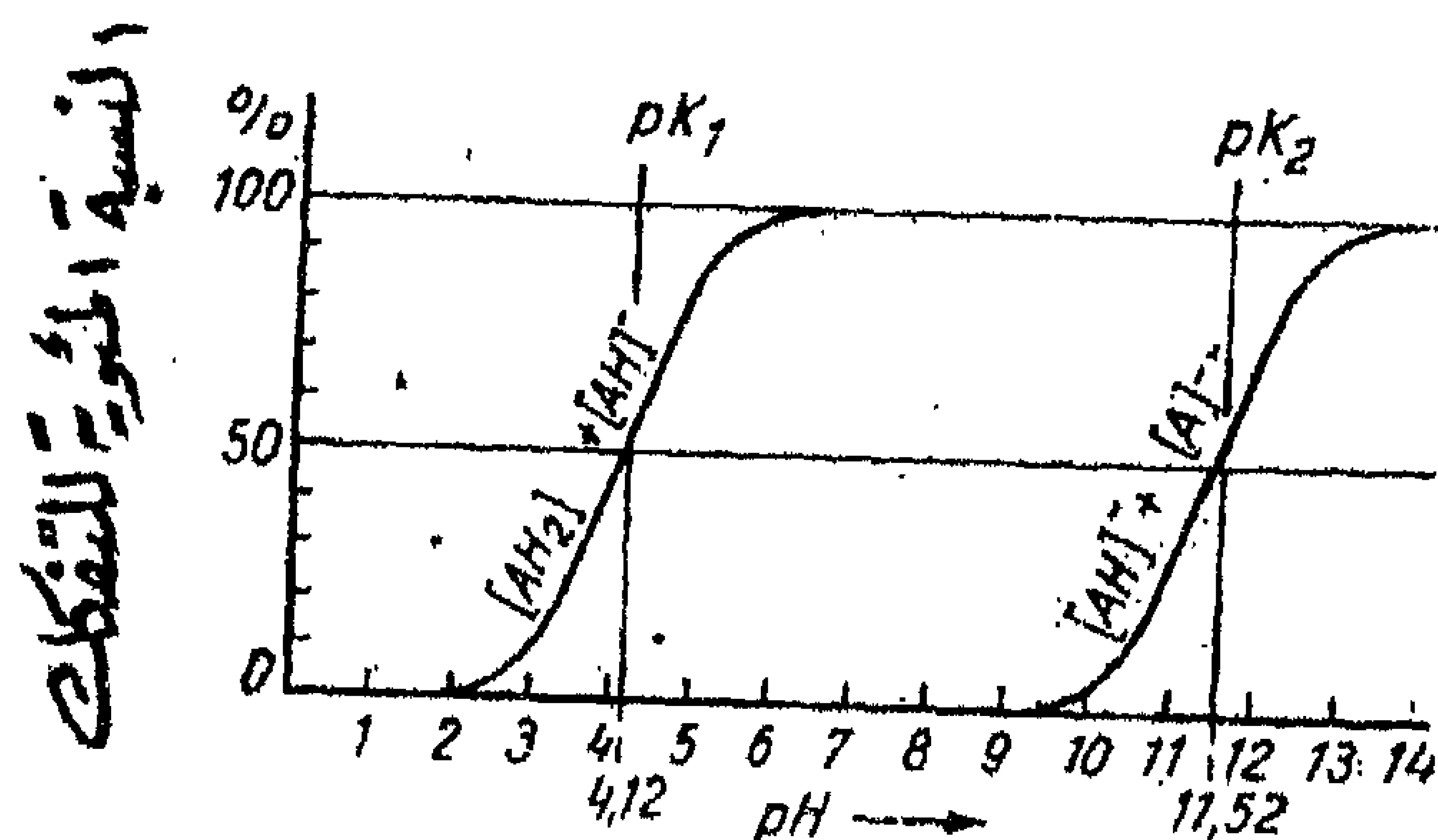
L-arabo ascorbic acid

شكل 1-15 الايزومرات الفراغية لحامض الاسكوربك

1-4-6-3 الخواص الفيزيائية الكيميائية لفيتامين C

فيتامين C حامض قوي نسبياً (pk_1= 4.1، pk_2=11.5) في درجة حرارة 25°م وتعزى هذه الخاصية إلى وجود مجموعة OH الأينولية الحامضية على C_3 التي تزداد حامضيتها بوجود كاربونيل اللاكتون المجاورة C_1 (انظر تركيب اسكوربات الصوديوم).

يمتلك محلول 2٪ لحامض الإسكوربك رقماً هيدروجينيا 2.8 في الماء وتعتمد نسبة التأين على الرقم الهيدروجيني (شكل 1-16).



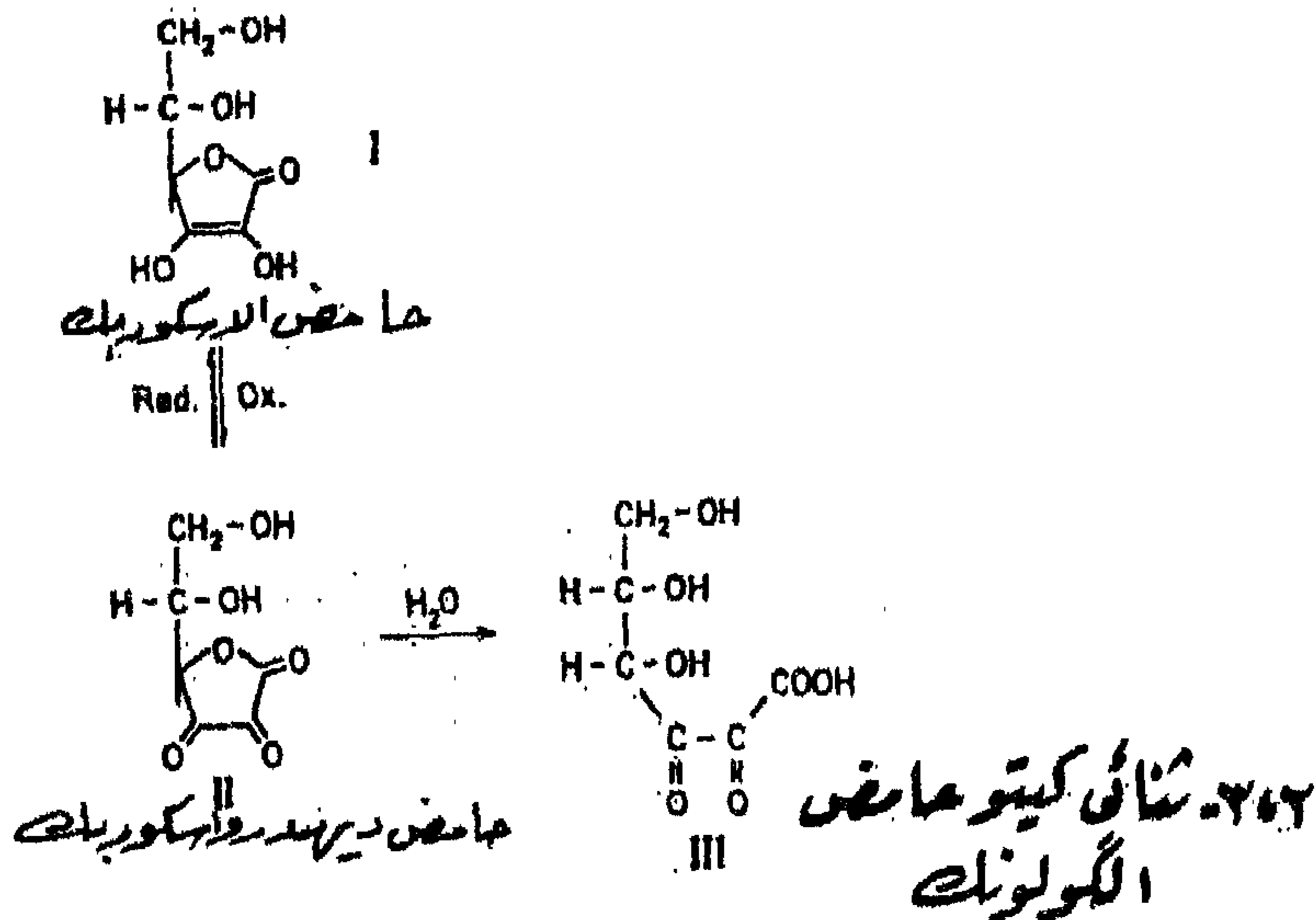
شكل 1-16 تفكك حامض الاسكوربيك وعلاقته بالرقم الهدروجيني (معبرا عنه كنسبة مئوية). ثابتا التفكك في الماء: pK_1 = 4.1 ، pK_2 = 11.5.

يظهر حامض الإسكوربيك امتصاصا قويا مختارا في المنطقة فوق البنفسجية ويختلف الطول الموجي لقمة الامتصاص مع الرقم الهيدروجيني للمحلول فهو 244 نانوميتر في pH=2 266. نانوميتر في PH=6-10 بينما يكون 294 نانوميتر في pH أعلى من 10.

إن من أهم خواص فيتامين C سهولة أكسدته فهو يمتلك قوة اختزال عالية ولقد بنيت عدة طرق لتقديره على هذه الخواص. وتعزى هذه الخواص إلى مجاميع Enediol للجزئية. عند الأكسدة، يفقد فيتامين C ذرتي هدروجين ويتحول إلى حامض Dehydroascorbic (شكل 1-17، II) الذي يمتلك أيضا فعالية مضادة للأسقربوط Anti-scorbutic إلا أن هذا الحامض نتيجة لعدم ثبات حلقة اللاكتون في المحاليل المتعادلة أو القاعدية يتأكسد إلى نواتج غير فعالة ويتخلل العملية تكوين حامض II2.3- Diketogulonic.

إن الأكسدة إلى حامض Dehydroascorbic عكسية في الزجاج In vitro وفي الحي In vivo. تستخدم هذه الخاصية في كيمياء الأغذية لتعيين تركيز فيتامين C الكلي.

ونظرا لإمكانية تحرير واكتساب الهيدروجين بسهولة، يستطيع حامض الإسكوربك وحامض Dehydroascorbic تكوين نظام أكسدة مرجع Redox system في الكائن الحي (لنقل الهيدروجين) ويخدم وظائف حيوية مهمة أيضاً.



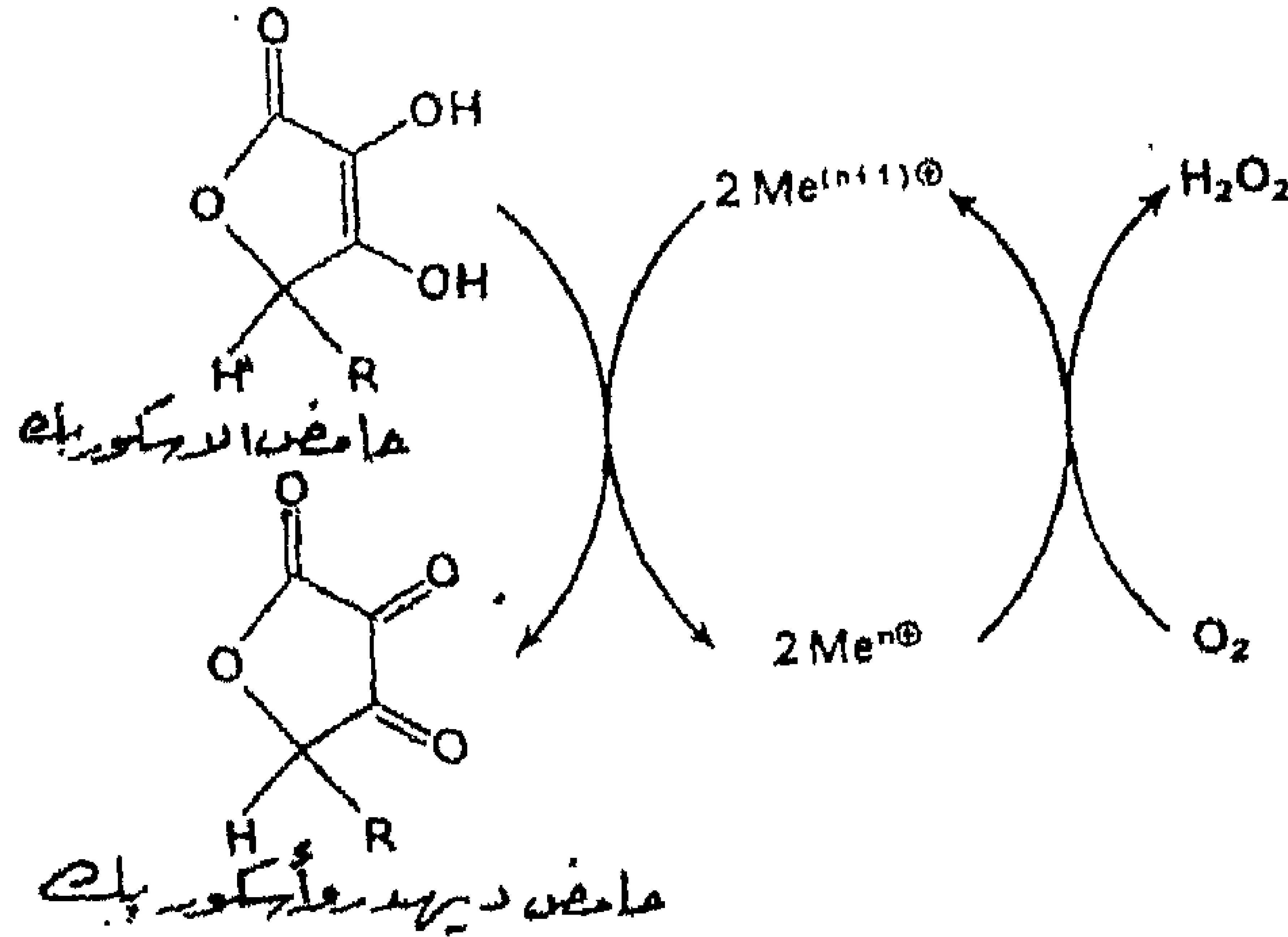
(1- 17) أكسدة حامض الأسكوربك

1-4-6-4 ثبات فيتامين C

إن خواص محلول حامض الاسكوربك في الماء (وكمثال حساسيته للأوكسجين والميل للأكسدة الذاتية والأكسدة الأنزيمية) تعتمد على الرقم الهيدروجيني للمحلول وبالتالي على نوع الأيونات الموجودة.

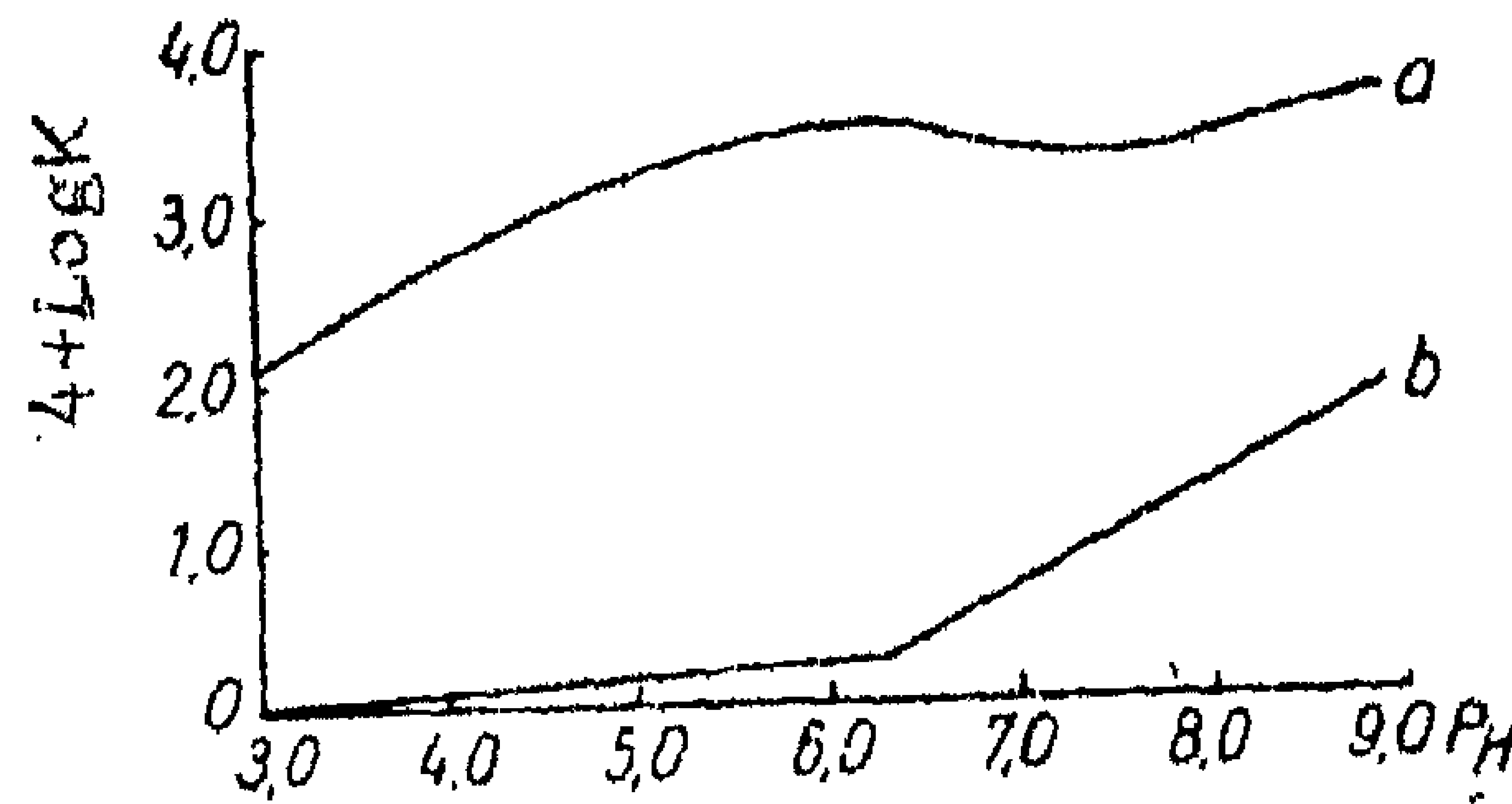
يكون فيتامين C ثابتا جدا في المحاليل الحامضية القوية عند غياب الأوكسجين وحتى بوجوده (الهواء) تكون محاليل فيتامين C النقية ثابتة وقليلة الحساسية للأكسدة. إلا أن المحيط المتعادل أو القاعدي أو وجود كميات ضئيلة من أيونات المعادن الثقيلة (كالنحاس والحديد) تؤدي إلى زيادة كبيرة في سرعة تفكك الحامض بوجود الأوكسجين وتكون أيونات النحاس CU^{2+} فعالة حتى

في تراكيزها الضئيلة إذ أن أكسدة حامض الإسكوربك تؤدي إلى تحول Cu^{2+}------CU^{+} وتعاد أكسدة أيونات النحاسوز مرة أخرى بالأوكسجين ويمكن تمثيل هذه العملية كالآتي:



(شكل 1-18).

وبصورة عامة تتناسب سرعة الأكسدة الذاتية لحامض الإسكوربك والأكسدة المحفزة بأيونات النحاس تناسبا طرديا مع التفكك Dissociation

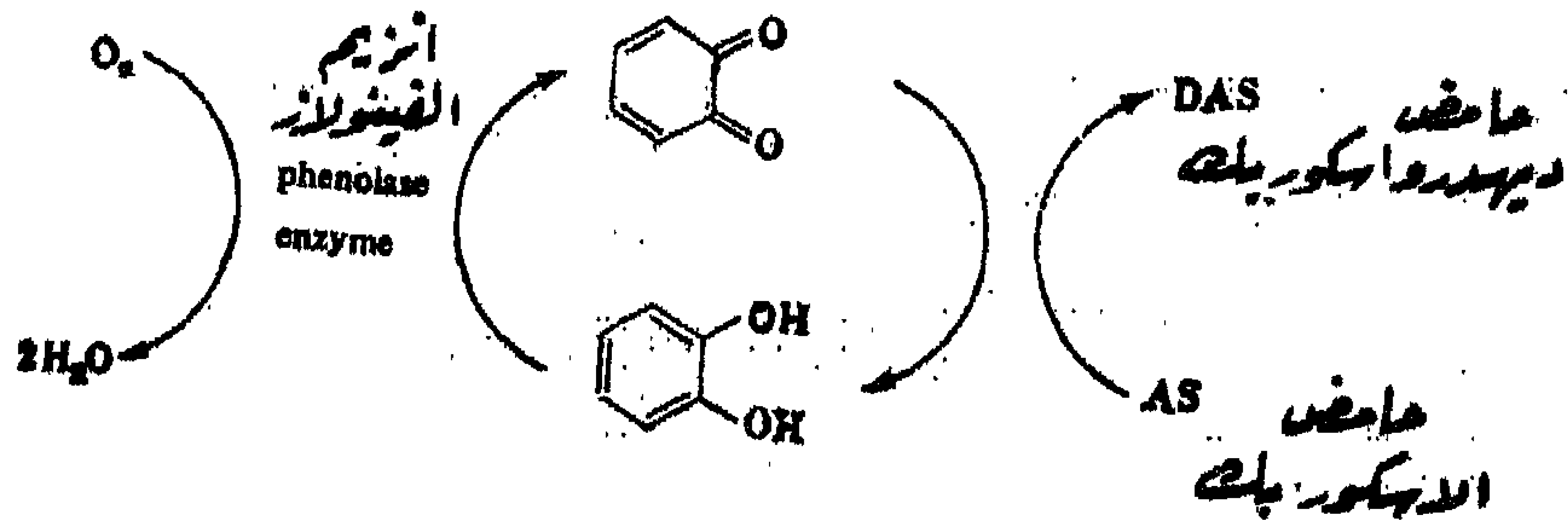


شكل 1-18 التغيرات في سرعة أكسدة حامض الإسكوربك مع تركيز أيونات الهدروجين بوجود a وعدم وجود b أيونات النحاس. تمثل K ثابت السرعة للأكسدة.

وفي الأغذية يعاني فيتامين C إضافة إلى الأكسدة الذاتية والأكسدة

بالمحفزات الفلزية الثقيلة، أكسدة أنزيمية. ويعزى للأكسدة الأنزيمية فقدان فيتامين C خلال الحصاد والنقل وخزن الخضراوات الحاوية عليه مثل السبانخ والبازلاء والفاصوليا وكذلك خلال المعاملة المنزلية والصناعية للمواد الغذائية.

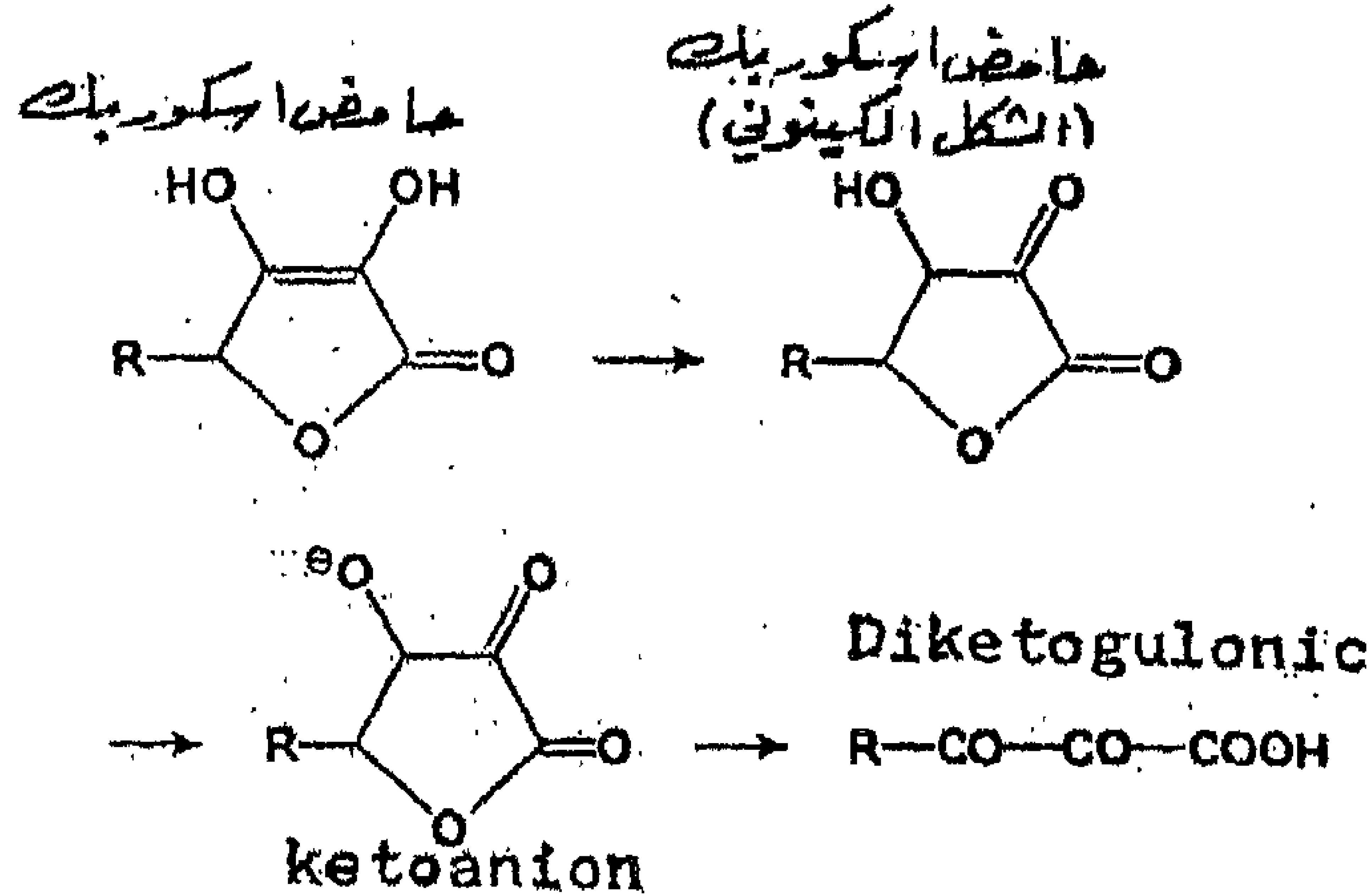
توجد سلسلة من أنزيمات الاوكسداز Oxidases المؤكسدة حامض الإسكوربك والتي تحوي نحاس Ascorbic acid oxidase phenolase أو حديد peroxidase, Cyto-Chrome oxidase كتميم العامل Cofactor. يستطيع اوكسداز حامض الإسكوربك فقط أن يؤكسد حامضي الإسكوربك هوائيا بصورة مباشرة بينما تهاجم الأنزيمات الأخرى حامض الاسكوربك بصورة غير مباشرة. فمثلا تعمل المركبات polyphenols وQuercetin و Catechin وحامض Chlorogenic بوجود الإنزيم phenolase بمثابة عامل لنقل الكترونات بين الأنزيم وفيتامين C.



(32 -1)

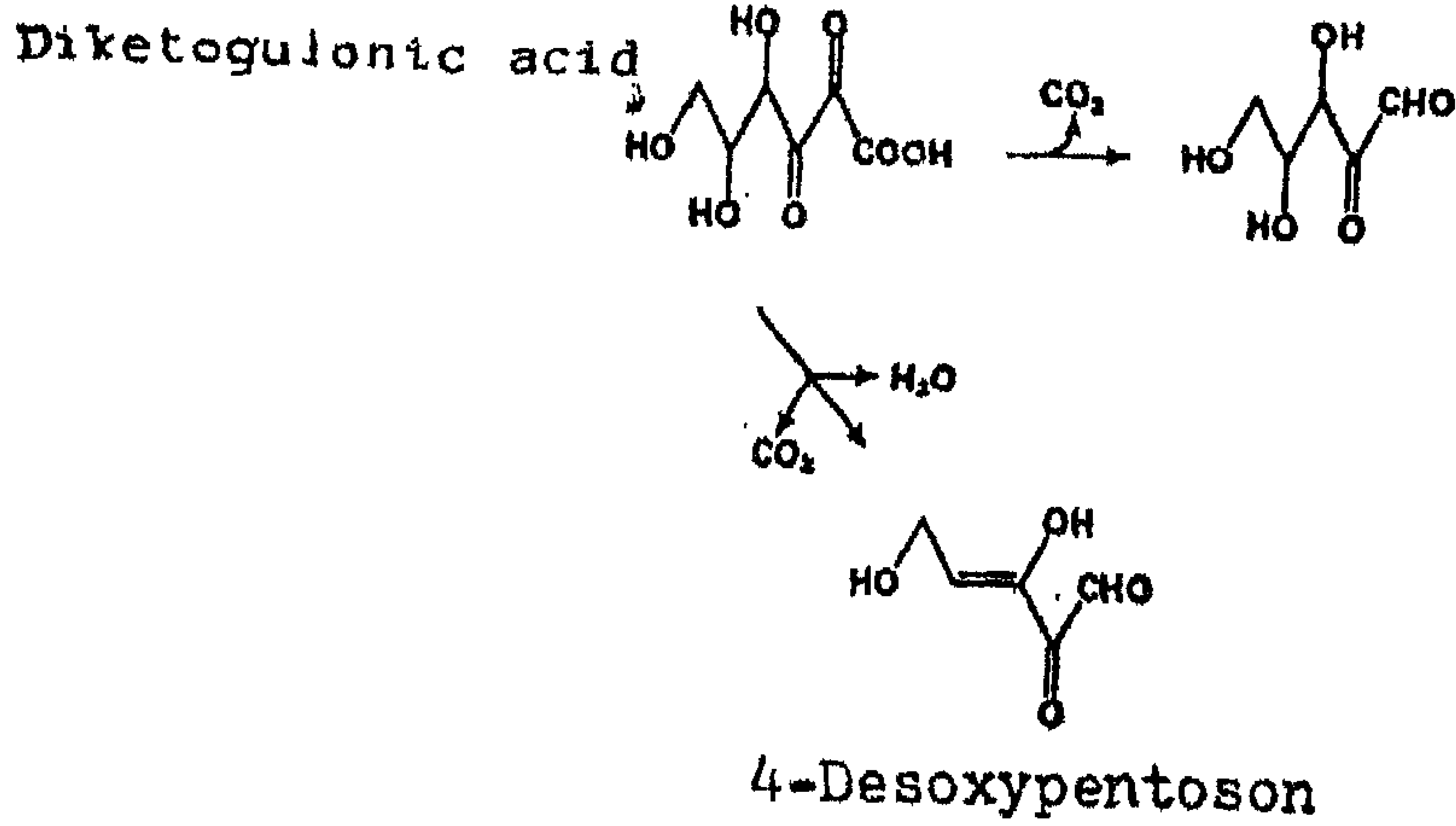
تتكرر هذه الحلقة من التفاعلات بوجود الأنظمة الأنزيمية السليمة في الخضراوات طالما كان هناك بقية لحامض الإسكوربك غير المؤكسد. ونظرا لعدم وجود الأنزيم polyphenol oxidase في الحيوانات، لا تحصل سلسلة التفاعلات المذكورة. وبطريقة مشابهة يتلف حامض الإسكوربك بوجود الأنزيم peroxidase من المهم جدا حماية فيتامين C من الأكسدة خلال خزن ومعاملة

الأغذية نظرا لأهميته الغذائية، ويمكن استثناء الأوكسجين بالخزن في الفراغ Vacuum أو بالمعاملة تحت غاز خامل. يكون التحلل اللاهوائي لحامض الإسكوربك بطيء جدا ويكون في أقصاه في PH=4 وفي أدناه في PH=2 ويحصل التفاعل عبر الصيغة الكيتونية لحامض الإسكوربك والكيتوانيون Ketoanion الذي يتحول إلى Diketogulonic.



(33-1)

يتحول حامض Diketogulonic بعد ذلك إلى Xyloson مثل 4-Desoxypen- toson الذي يتحول بالتالي إلى Ethylglyoxal.



(34-1)

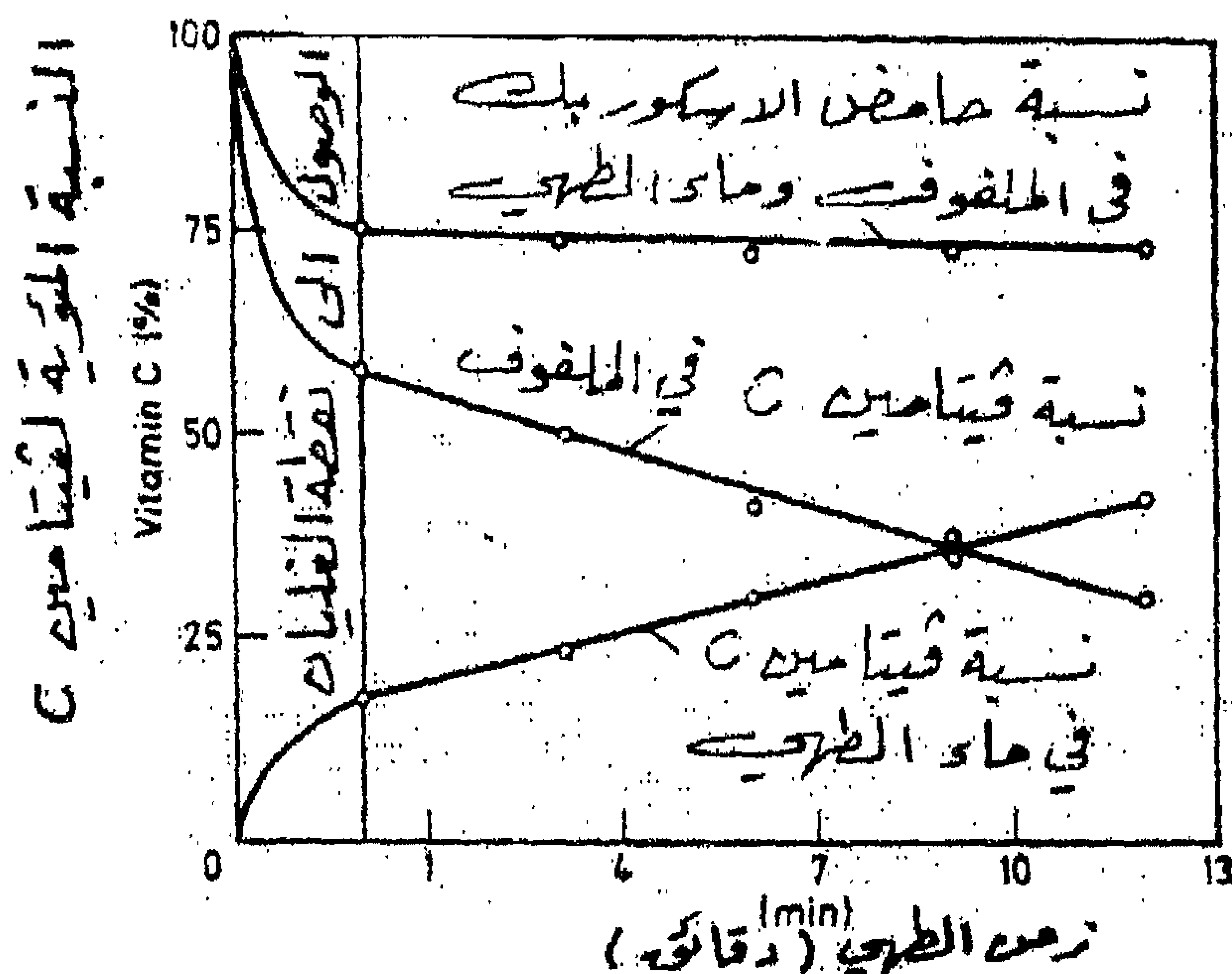
يجب نقل الخضراوات الحاوية على فيتامين C في درجات حرارة واطئة. تعيق بعض المواد الموجودة بصورة طبيعية في الأغذية أكسدة حامض الإسكوربك المحفزة بالفلزات الثقيلة (جدول 1-7).

جدول 1-7 النواتج الطبيعية الموجودة في المواد الغذائية والتي تعيق أكسدة حامض الإسكوربك المحفزة بالفلزات الثقيلة.

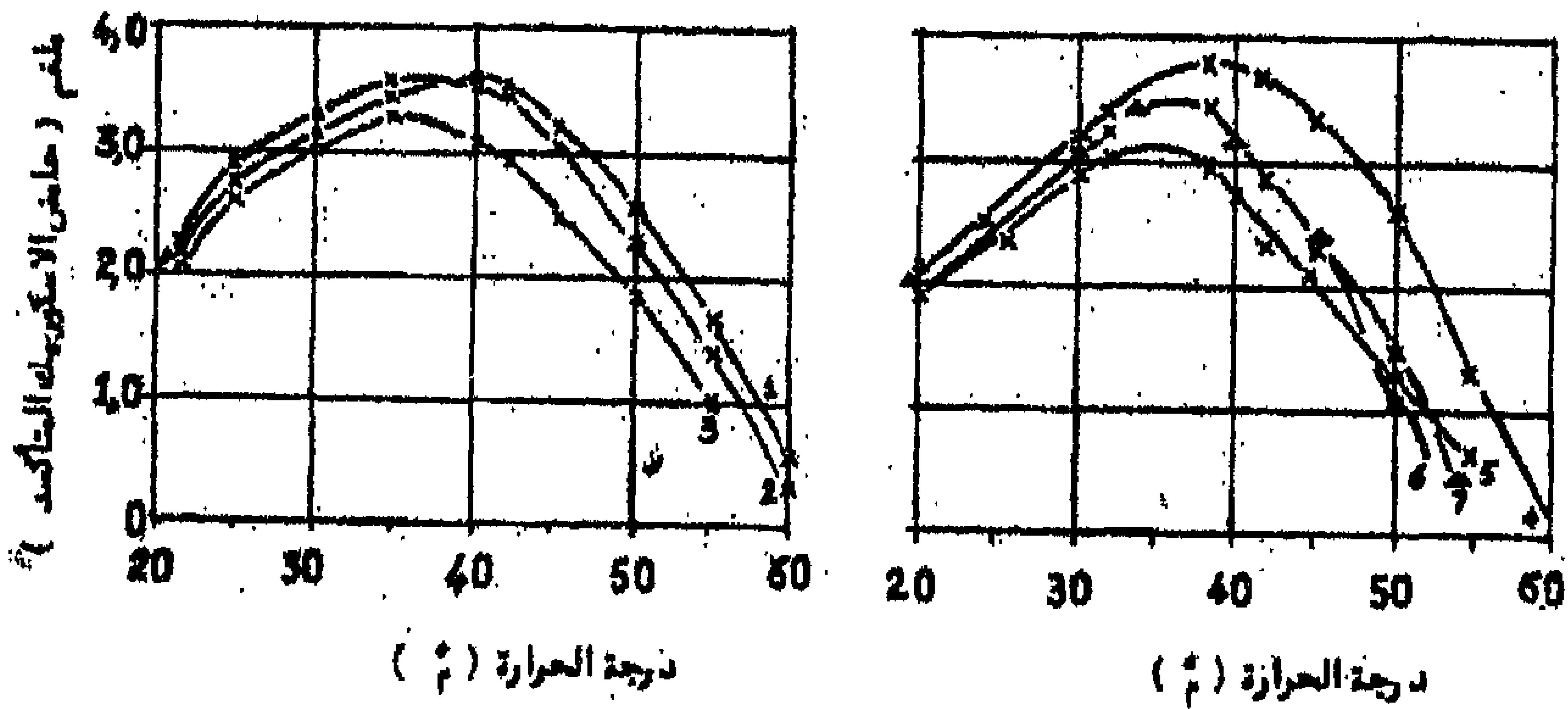
اسم المادة	أمثلة
أحماض امينية	كلايسين، كرياتين، كرتياتين.اسباراجين، حامض الكلوتامك، ستنين
بروتينات	جميع البروتينات
أحماض هدروكسيلية	حامض السترك وحامض التارتارك
أحماض ثنائية الكربوكسل	حامض الاوكزالك
بكتينات، تانينات	Anthocyanins, Quercitol
وFlavenoids	و Catechins

ويجب أن لا يخفى على القارئ بأن البروتينات والسكريات والبكتينات تثبت فيتامين C في المحلول بطريقة فيزيائية بحتة وذلك بتقليص سرعة انتشار الأوكسجين إضافة إلى تكوين جسور هدروجينية بين جزيئة الفيتامين ومجاميع $-OH$ و $>NH<$ و $>CO$ و $COOH$ للبروتينات والسكريات والبكتينات.

ويمكن منع التلف الأنزيمي لفيتامين C في الأغذية بتثبيط الأنزيمات المؤكسدة بالحرارة وكمثال بالسلق ومن جهة أخرى تؤثر درجة الحرارة وفترة المعاملة في القيمة الغذائية لفتيامين C في الأغذية نتيجة للأكسدة الذاتية والأكسدة المحفزة بالفلزات الثقيلة كما في الشكلين (1-19) و (1-20):



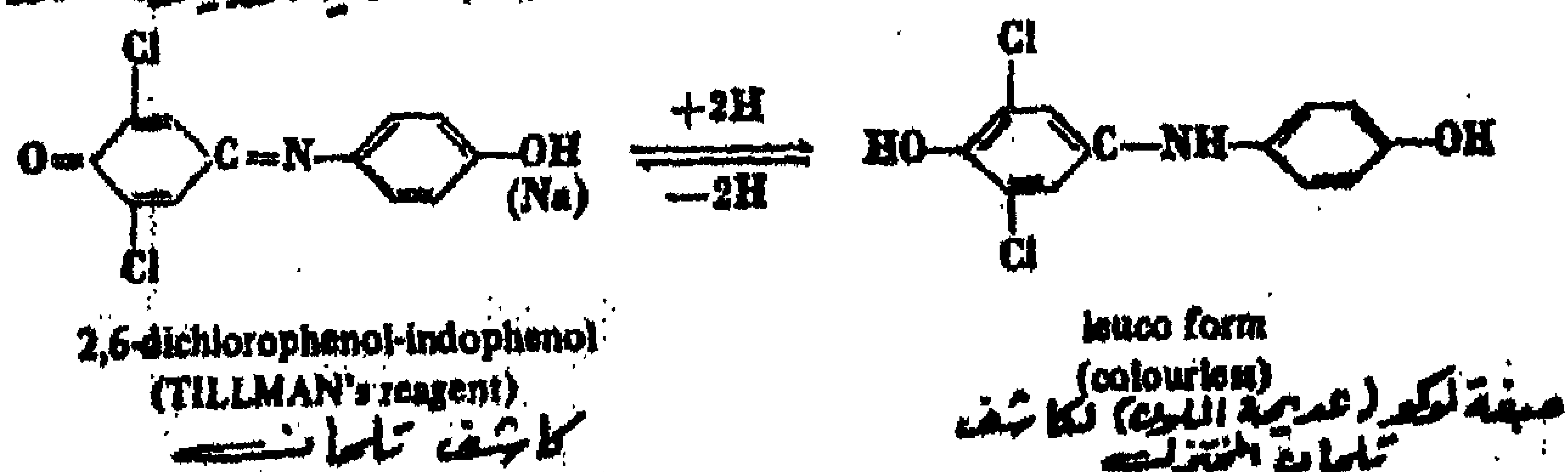
شكل 1-19 فقدان حامض الاسكوربك عند طهو اللهانة (الملفوف)



شكل 1-20 يمثل العلاقة بين نشاط أنزيم الاسكوربينيز ascorbinase من مصادر مختلفة ودرجة الحرارة 1- القرع 2- القرنبيط 3- الكرنب 4- اجنة البقوليات 5- الخيار (I) 7- الجزرالاصفر.

1-4-6-5 تعيين فيتامين C

تستخدم الخاصية الاختزالية القوية للفيتامين اساساً لجميع طرق تعيينه تقريبا. يمكن تعيين فيتامين C باستخدام عامل مؤكسد وكمثال محلول اليود، أو محلول صبغة المثيلين الزرقاء Methylene blue أو محلول الصبغة 2.6-Dichlorophenol indophenol والمسمى كاشف تلمان Tillmans reagent. إن الصبغة الأخيرة مهمة ذلك لإمكانية جعلها متخصصة للفيتامين. تكون الصبغة حمراء في المحاليل الحامضية وزرقاء في المحاليل المتعادلة أو القاعدية وعديمة اللون بصيغتها المختزلة.



(35-1).....

بالنظر لحساسية فيتامين C تجاه الأوكسجين، يجب استخلاصه من المواد الطبيعية في محيط حامضي باستعمال حامض الميتافسفورك أو الأوكزالك لتثبيت المحلول. وفي بعض الحالات يفضل إزالة المواد التي تتداخل وعملية تعيين الفيتامين وكمثال المواد الملونة والعوامل المختزلة وعوامل الدباغة أو الببتيد كلوتاثايون Glutathione ويفضل استخدام الكروماتوكرافي الورقي لهذه الغاية، كما يمكن استخدام البولاروكرافي لتعيين فيتامين C.

يمكن تعيين فيتامين C بطريقة خصوصية جدا وذلك باستخدام الأنزيم أوكسداز حامض الإسكوربك Ascorbic acid oxidase المستخلص من الخيار أو القرع.

إن أكثر الطرق خصوصية هي الطريقة الحيوية باستخدام الحيوانات واستخدام اختبار اتقاء prophylactic وعلاج مرض الإسقربوط ولكنها تستغرق وقتا طويلا.

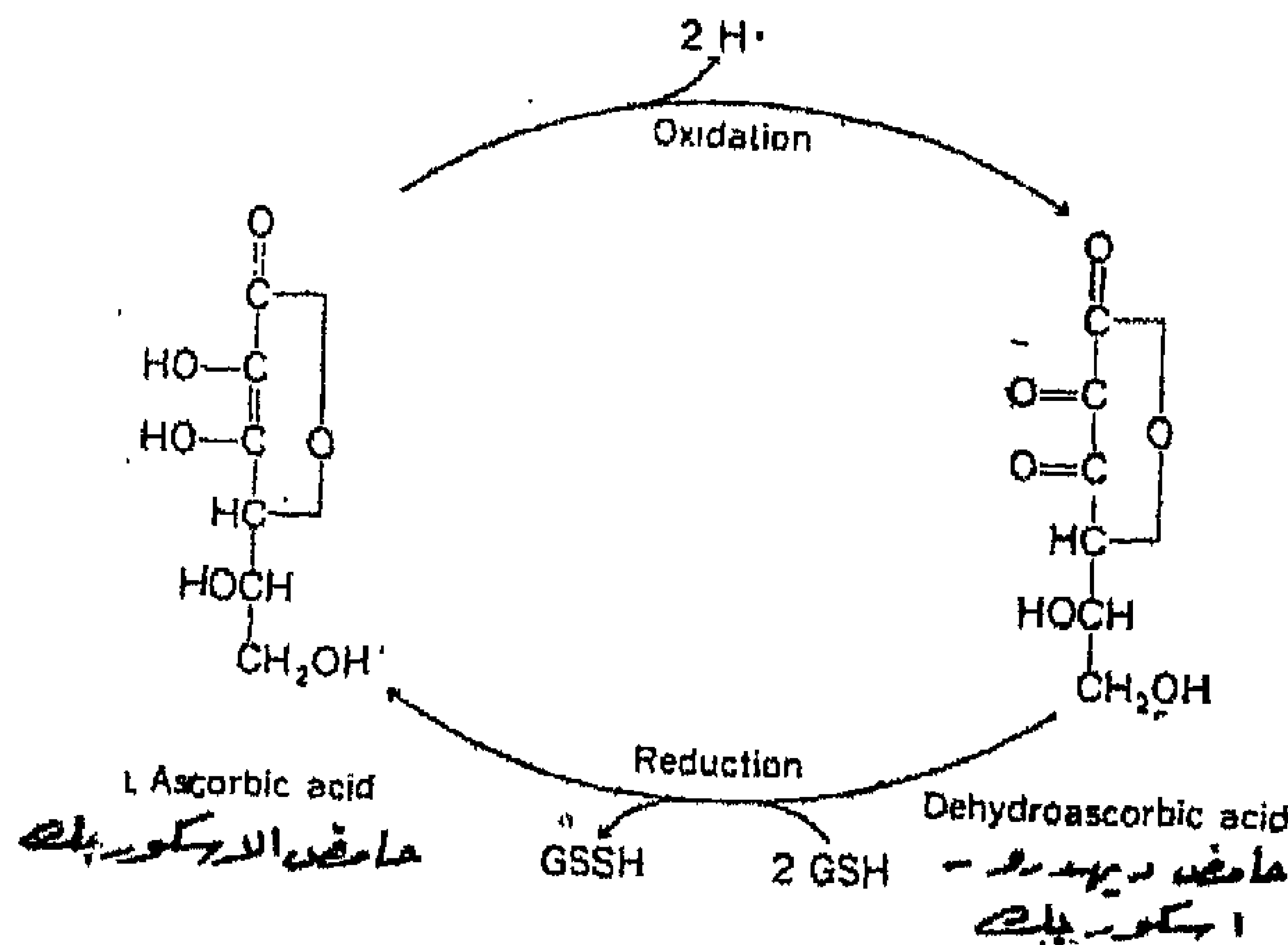
1-4-6-6 الوظيفة الكيميائية الحياتية

يؤدي نقص فيتامين C في غذاء الإنسان إلى مرض الإسقربوط المتميز بالوذمة edema والنزف تحت الجلد وفقر الدم وتغيرات مرضية في الأسنان واللثة

ولقد عرف المرض قديما وخصوصا لدى البحارة الذين تستغرق رحلاتهم زمنا طويلا بحيث لا يحتوي غذاؤهم على الفواكة أوالخضراوات الطازجة.

إن من أهم ميزات مرض الإسقربوط هو التغير في الأنسجة الرابطة وتصبح عديدات السكريد المخاطية Mucopoly saccharides غير طبيعية في خصائصها وتحدث تغيرات ملحوظة في ألياف الكولاجين. ويعتقد بأن الحامض الاسكوربك دور مهم في تحول البرولين إلى الهدروكسي برولين الذي يوجد بتراكيز عالية نسبياً في الكولاجين.

مما لاشك فيه، العلاقة الوطيدة بين الفعالية الكيميائة الحيوية لفيتامين C وخاصيته بوصفه عاملا مختزلا جيدا. يمكن اختزال الصيغة المؤكسدة لحامض الإسكوربك Dehydroascorbic إلى حامض الاسكوربك بمواد مختزلة مختلفة وكمثال الببتيد كلوتاثيون Glutathione. وتشكل صيغتا حامض الإسكوربك نظام أكسدة واختزال عكوس (شكل 1-21).



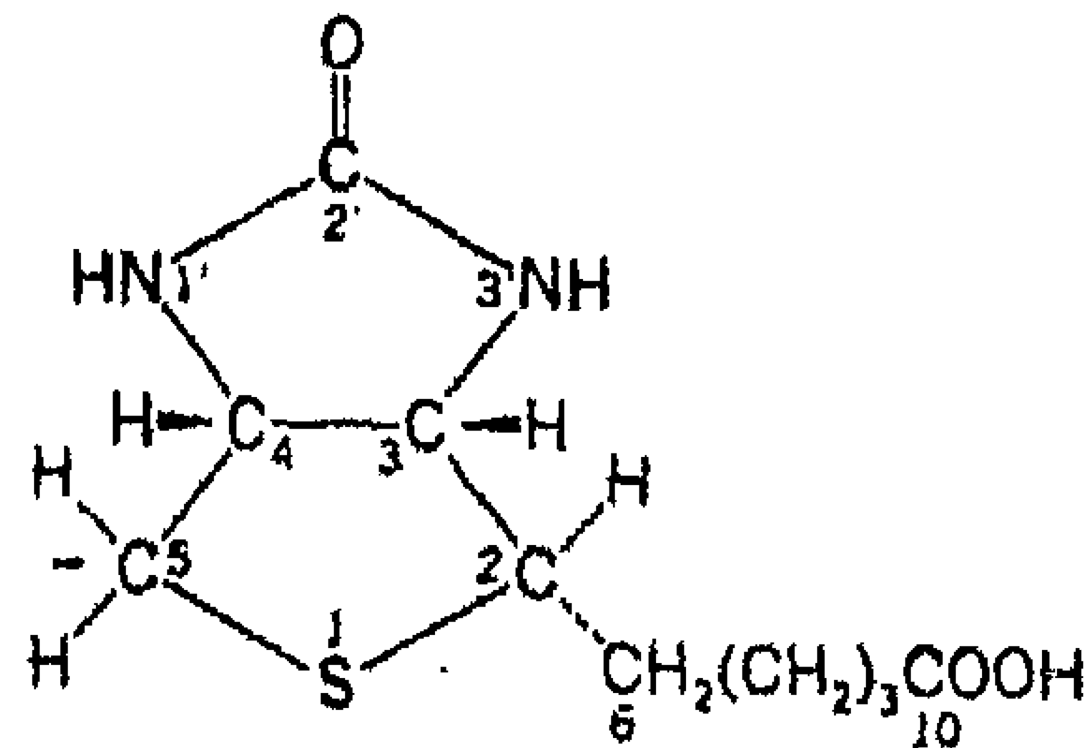
(36 -1)

شكل 1-21 نظام الأكسدة والاختزال (الاكسدة المراجعة) العكوس لحامض الإسكوربك بوجود الكلوتاثيون.

كما ويعمل حامض الإسكوربك عاملا مختزلا لتحويل البروتين إلى الهدروكسي برولين عند تكوين الكولاجين، يساهم أيضاً عاملا مختزلا في هدروكسلة الحامض بارا- هدروكسي فنيل بايروفك P-Hydroxyphenyl pyruvic إلى هو موجنتسك Homogentisic في الكبد وفي تحول الدوبامين إلى هورمون النوابينفرين والذي يحصل في غدة الكظر Adrenal وهكذا يتضح دور فيتامين C في تفاعلات الهدركلسة في الخلية.

7-4-1 البيوتين Biotin

في عام 1936 تم عزل عامل نمو للخميرة- بلوري الشكل – من صفار البيض وسمي Biotin وبعد بضع سنوات اكتشف عامل جوهري لنمو وتنفس الريزوبيوم Rizobium و سمي Coenzyme R واكتشف بعدئذ بأن العاملين متماثلان.



Biotin

ولقد عرف سابقا، بأن وجود كميات كبيرة من بياض البيض النيء في الأغذية التجريبية يؤدي إلى أعراض سمية في الجرذان تتميز بالتهاب الجلد وفقدان الشعر وعدم التناسق العضلي Muscular incoordination وأن الخميرة والكبد وبعض المواد الغذائية الأخرى تحتوي مواد تحمي الجرذان من الضرر الناتج عن البياض النيئ، وفي عام 1940 أصبح جلياً بأن البيوتين وعامل السمية الموجود في بياض البيض متماثلان.

1-4-7-1 البيوتين وتغذية الإنسان

ومن أهم المصادر الغذائية للبيوتين: الكبد والحليب واللحوم والخضراوات، ويكمل النبيت المعوي Intestinal flora محتوى الفيتامين في الأغذية إلا أن تخليق الفيتامين من قبل النبيت المعوي يعتمد على تكوين الغذاء المتناول.

يقدر حاجة الإنسان للبيوتين 150-300 ميكروغرام يوميا. ويزود النبيت المعوي كل ما يحتاجه الإنسان منه تقريبا وعند قلة هذا النبيت في الأمعاء لسبب من الأسباب وكمثال وجود بعض الأمراض المعوية والعلاج بالمضادات الحيوية، يحتاج الإنسان إلى البيوتين في غذائه.

إذا وجدت كميات كبيرة من بياض البيض النيء في الغذاء، فإن بروتين الافدين Avidin الموجود فيه يرتبط بالبيوتين والبروتينات الحاوية عليه و؟؟ المعقد الناتج Biotin-Avidin مقاوما لأنزيمات التحلل المائي (الحلمهة) للسبيل المعدي المعري وبذلك لا يمتص البيوتين ويصاب الإنسان بنقص فيه.

1-4-7-2 التخليق الحيوي للبيوتين

تم دراسة تخليق البيوتين في مختلف الأعفان والبكتريا. يوضح الشكل (1-22) المسلك المقترح نتيجة للدراسات على البكتريا E.Coli.

Oleic acid → Azelaic acid

↓ + CoA

Azelaoyl CoA ⇢ (+ Acetyl SCoA, + CoA) Pimeloyl CoA

↓ + alanine, + pyridoxal phosphate, − "C"

7-Keto-8-aminopelargonic acid → (+ met(Ade), + pyridoxal phosphate) 7,8-Diaminopelargonic a

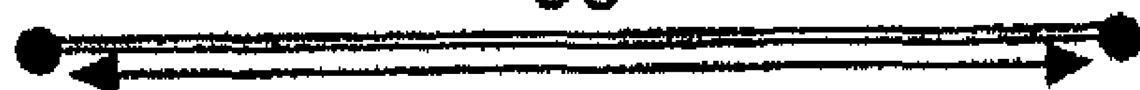
↓ + ATP, + CO_2, + Mg^{2+}

Desthiobiotin → (+ "S") Biotin

شكل 1-22 المسلك المقترح لتخليق البروتين في البكتريا E.Coli وكائنات أخرى.

يتم اندماج جميع ذرات الكربون لحامض البملك Pimelic acid في البيوتين (شكل 1-22) ويعوض هذا الحامض ثنائي الكربوكسيل وكذلك حامض الأوليك وأزليك Azelaic عن البيوتين في الأوساط الزراعية لعدة كائنات مجهرية. ويمكن التكهن بأن الإنفلاق Cleavage التأكسدي للاوليت Oleate في الأصرة المزدوجة 9-10 يؤدي إلى إعطاء الحامض Axelaic.

إن مشتق التميم A(Azelaoyl CoA) يعطي Acetyl CoA و pimeloyl CoA بالمسلك الإعتيادي لتفاعلات الأكسدة بيتا B. oxidation يستطيع كلا مشتقي حامض البلاركونك (شكل 1-22) مساندة نمو بعض طوافر Mutants البكتريا E.Coli التي لا تستطيع تخليق البيوتن، وأن الأنزيم الناقل للمجوعة

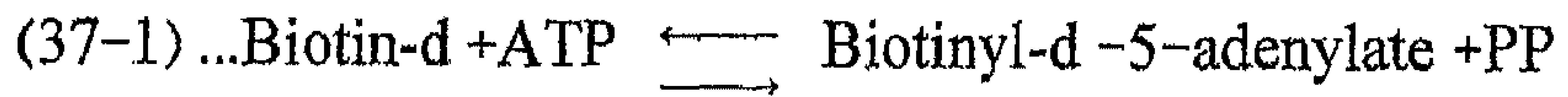


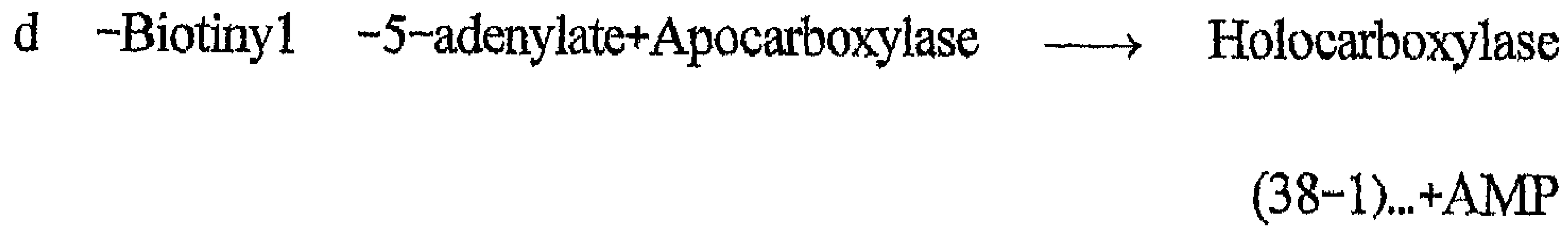
الأمينية Aminotransferase في البكتريا E.Coli، يستخدم -بصورة متميزة -L 8-Adenosyl methionine بوصفه واهبا لمجموعة الامينو عند تكوين الحامض 7.8-Diamino pelargonic يتفكك الناتج وهو الحامض 2-OXO 4-methyl thiobutyric 8-Adenosyl إلى حامض -3-oxo -2 .5-methyl thioadenosine .butenoic

لا يعرف مصدر ذرة الكبريت ويخمد المسلك بأكمله بوجود -5- Biotinyl adenylate في الوسط.

يكون البيوتين في الأنزيمات الحاوية عليه، مرتبطا تساهميا بآصرة اميدية إلى مجموعة الامينو ايبسلون (E) لمثالة لايسين.

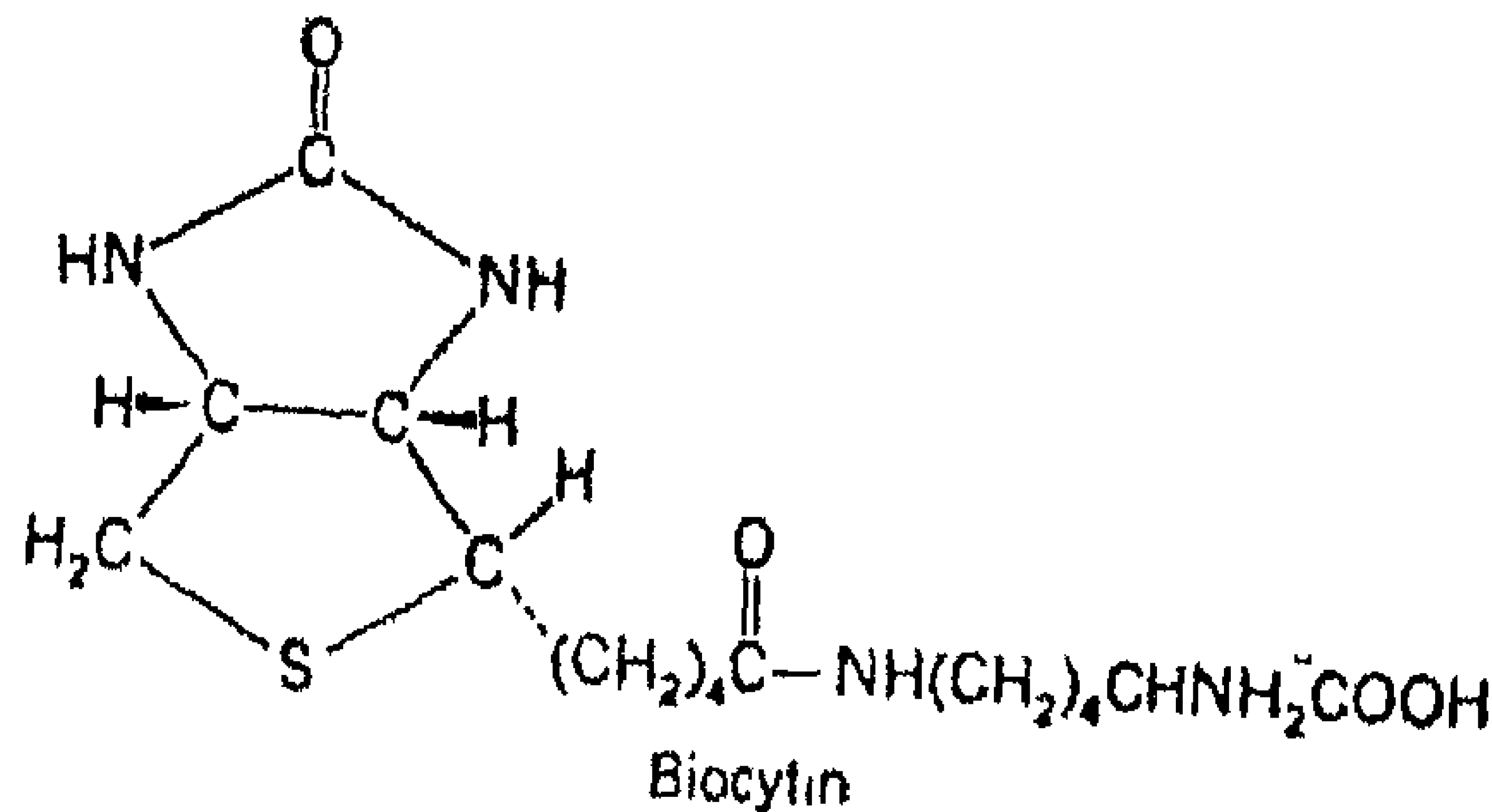
يشتمل هذا الإرتباط على تنشيط البيوتين بوجود المركب ATP ويعقب ذلك اقترانه بالبروتين بوجود الأنزيم Holocarboxylase synthetase


(37-1) ...Biotin-d +ATP ⇌ Biotinyl-d -5-adenylate +PP


d -Biotiny1 -5-adenylate+Apocarboxylase ⟶ Holocarboxylase

(38-1)...+AMP

ولقد أمكن عزل المركب Biocytin -E- N- biotinyl -L- lysine - ناتجا للتحلل المائي للبروتينات الحاوية على البيوتين:

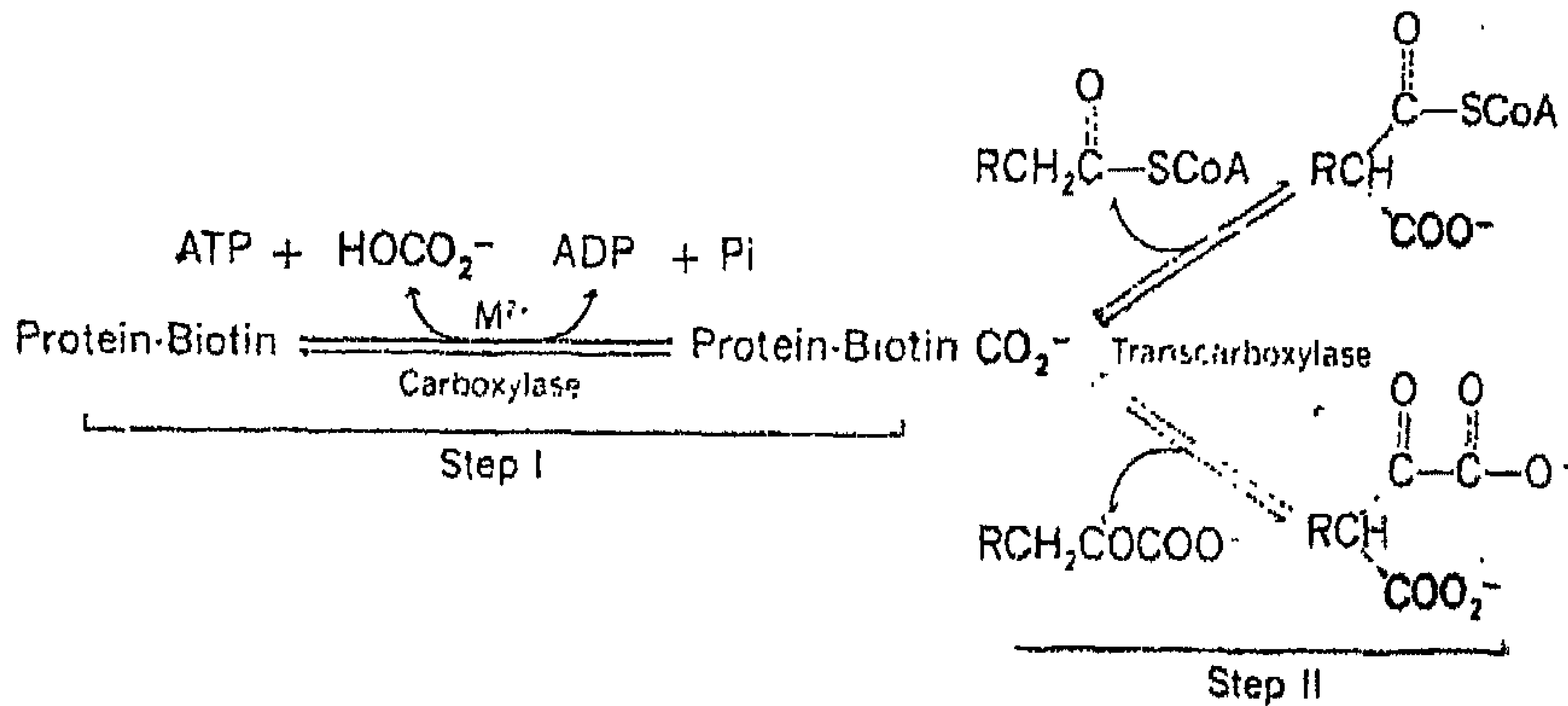


Biocytin

3-7-4-1 الوظيفة الكيميائية الحياتية

يـشكل البيـوتين المجموعـة الـضميمة group prosthetic لأنـواع الأنزيمـات المحفـزة لتثبيـت ثـاني أوكـسيد الـكربـون في آصـرة تـساهمية وكمثال الأنزيمات Acety (CoA / carboxylase و CoA/ Carhoxylase و Propiony Transcalboxylase (/Methlmalonly و pyruvate Carboxylase ولهذا فإن نقصه في الأنسجة يؤدي إلى إنخفاض قدرتها على اندماج CO_2 في الاوكزالواستات وعلى تخليق الأحماض الدهنية.

يمكـن تقـسيم التفاعـل الاجمـالي للكريكـسلة- والمحفـز بأنزيمـات الكربوكـسيلاز المعتمـدة علـى البيـوتين- إلى مـرحلتين متميـزتين، إذ تـشتمل تفاعلات الكريكسلة على كريكسلة البيوتين في البروتين الناقل لمجموعة الكربوكسيل Biotin Carboxylase ثم نقلها لاحقا إلى مركب مستلم بتحفيز أنزيم Transcarboxylase.



(39-1) ...

تتضمن المرحلة الأولى تكوين Carboxyl biotinyl enzyme تتضمن المرحلة الثانية نقل الكربوكسيل إلى ركيزة مستلمة مناسبة تبعاً لخصوصية الأنزيم Transcarboxylase ذي العلاقة. يمثل الأنزيم pyruvic carboxylase نموذجاً للأنزيمات المستخدمة للحوامض الفا- كيتو بمثابة مستلمات بينما يشكل الأنزيمان Acetyl CoA Carboxylase propionly CoA Carboxylase مثالين لأنزيمات مستخدمة Acyl CoA بمثابة مستقبل.

تمت دراسة آلية تحول Acetyl CoA إلى Malonyl CoA بصورة مكثفة في البكتريا E.Coli وبينت النتائج التسلسل التالي للتفاعلات التي يساهم فيها ثلاثة بروتينات:

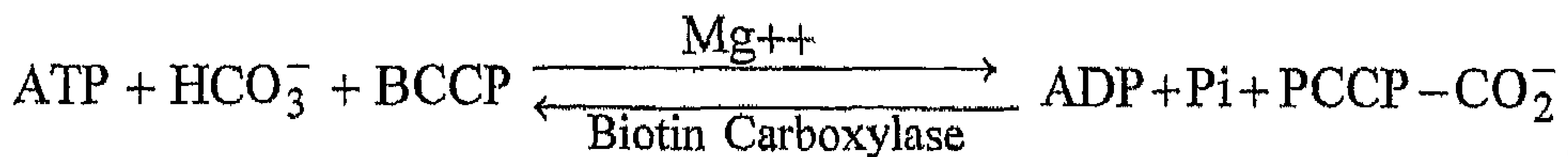
وهي

أ- Biotin carboxylase

ب- Biotin carboxyl carrier protein (Bccp)

ج- Acetyl CoA. Malony1 CoA trans carboxylase

أ ب ... (1-40)



$$ATP + HCO_3^- + BCCP \underset{\text{Biotin Carboxylase}}{\overset{Mg++}{\rightleftharpoons}} ADP + Pi + PCCP - CO_2^-$$

(1-41) ...

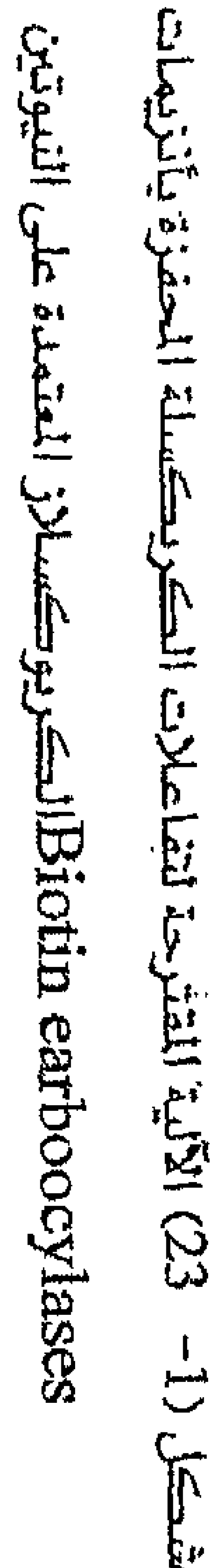


$$BCCP - CO_2^- + AcetylCoA \underset{\text{Trans Carboxylase}}{\rightleftharpoons} PCCP + MalonylCoA$$

ولقد وضعت الآلية الآتية لهذه التفاعلات (شكل 1-23)

أ. كربكسلة البيوتين المرتبط بالأنزيم بوجود ATP. لاحظ دور ذرة النتروجين النيوكليوفيلية رقم 1 للبيوتين حيث ترتبط تساهميا مع أيون الكربوكسلات لتكوين N- Carboxybiotin

ب. يحفز الأنزيم إزالة الفا- هدروجين من الركيزة Acyl-CoA وتكوين ايون الاينولات للثايواستر الذي يهاجم بدوره مجموعة الكربوكسيل للكربوكسي بيوتين Carboxybiotin N- فينفصل معقد الأنزيم- بيوتين وبتكون الحامض بيتا- كيتو المرتبط بتميم الأنزيم Carboxylated acyl (CoA) A



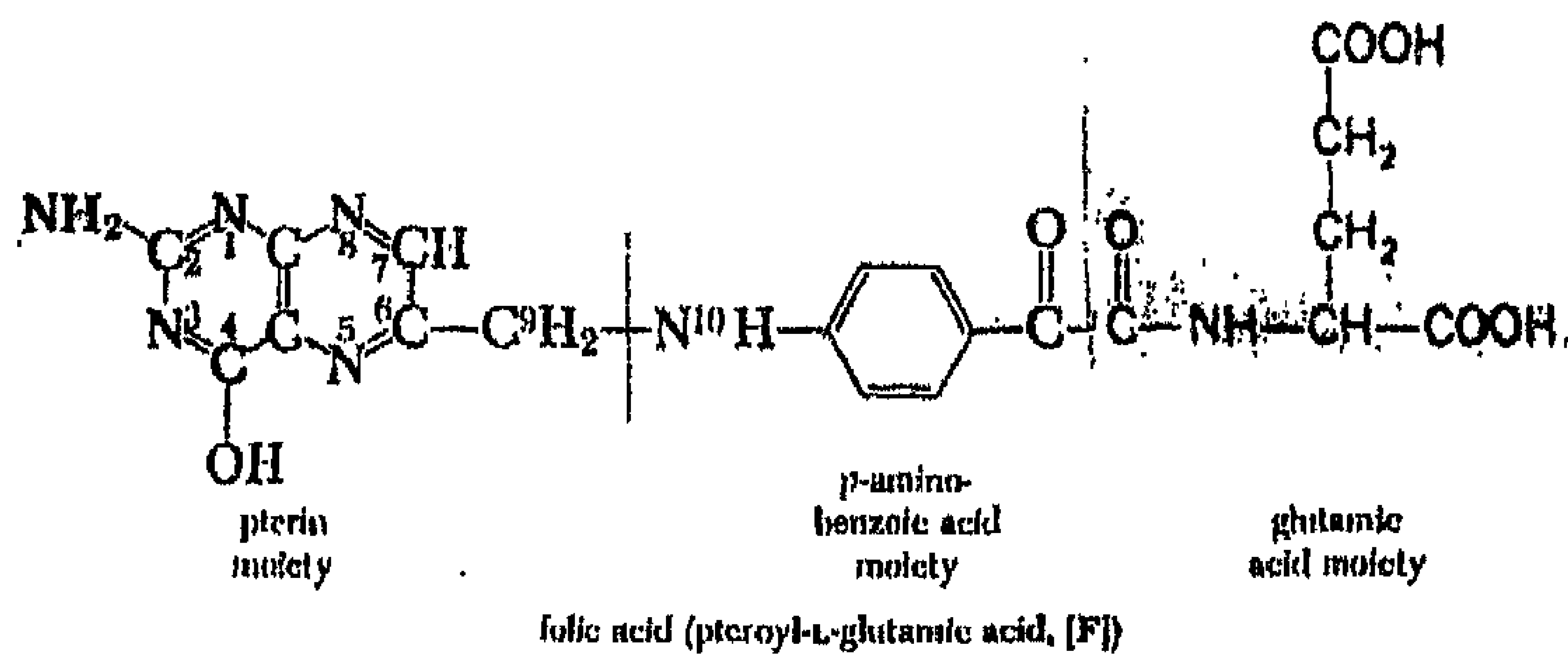
شكل (1- 23) الآلية المقترحة لتفاعلات الكربكسلة المحفزة بأنزيمات الكربوكسيلاز المعتمدة على البيوتين Biotin earboocylases

يلعب البروتين Beep دوراً اساسياً في هذه التفاعلات وهو ثنائي دون الوحدة Dimer ذو وزن جزيئي 44000 ويحوي 2 مول بيوتين لكل مول، ويتصل

البيوتين بالسلسلة الببتيدية من خلال جسري لا يسيل Lysylbridges.

الأنـزيم Biotin Carboxylase ثنـائي دون الوحـدة ذو وزن جزيئـي 98000 وتكون دون الوحدتين متماثلتين والوزن الجزيئي 510000 لكل منهما أما الأنزيم Transcarboxylase فهـو ربـاعي دون الوحـدة Tetramer ذو وزن جزيئـي 130000 ويقدر الوزن الجزيئي لدون الوحدات 30000و35000.

1-4-8 حامض الفولك pteroyl-L- glutamic acid



folic acid (pteroyl-L-glutamic acid, [F])

يتكون حامض الفولك من ثمالة

2- Amino 4- hydroxy -6-Methylpteridine وثمالة بارا- امينوبنزوك -p Aminobenzoic acid وثمالة كوتامك Glutamic acid

توجد مجموعة مركبات حامض الفولك في جميع أنسجة الحيوانات والنباتات ولكن بتراكيز ضئيلة جداً. يوجد تركيز عال لحمض الفولك 50-100 mg/100 gm في الخضراوات الورقية داكنة الخضرة وفي الخضراوات الخضراء الطرية وفي كبد وكلى الحيوانات المستخدمة بوصفها غذاء بينما توجد كميات قليلة في لحم البقر والحبوب والجذور والنباتات والطماطة والجبن والحليب.

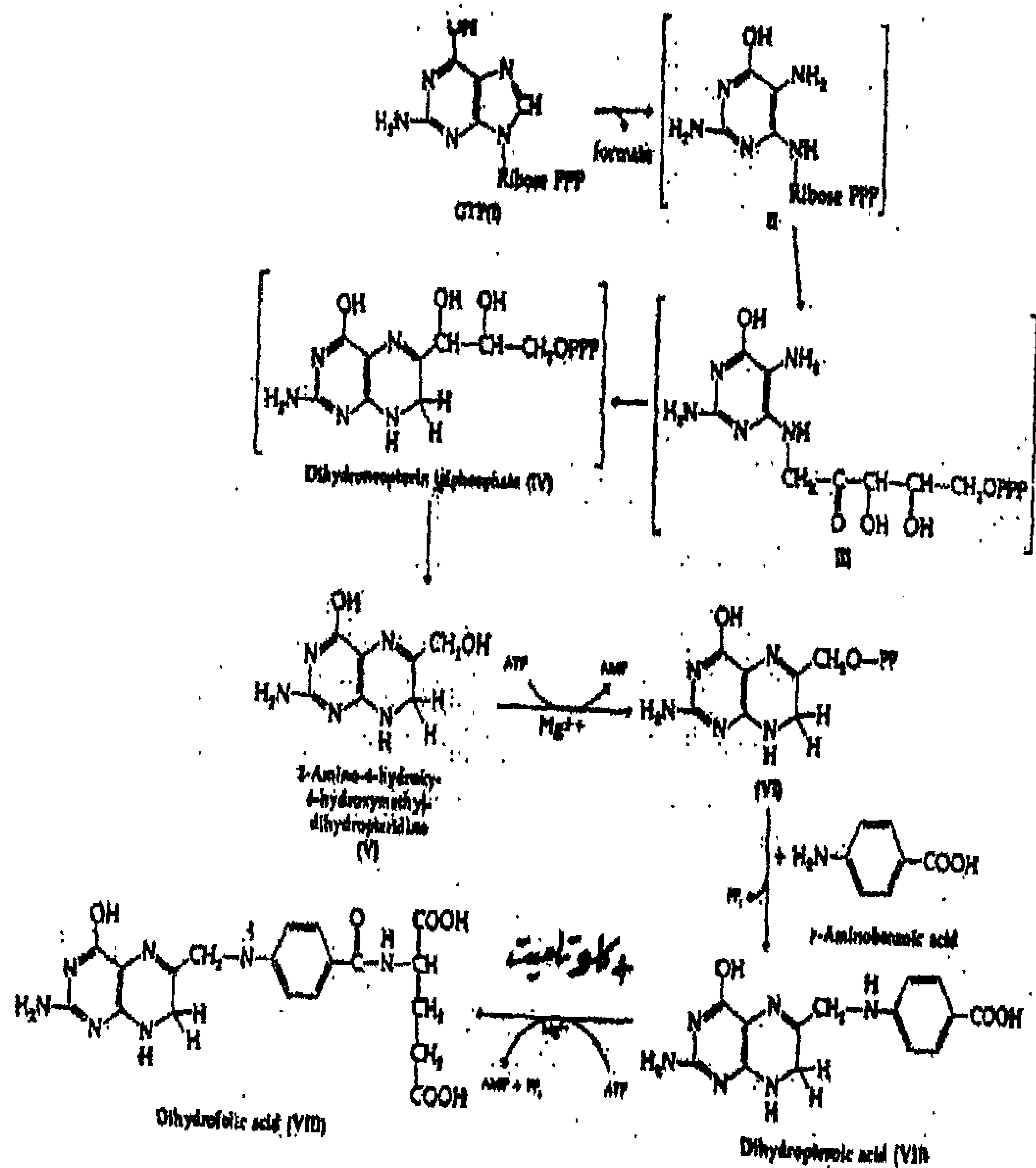
حامض الفولك قليل الذوبان في الماء البارد والكحول ويزداد ذوبانه في الماء الحار. يذوب حامض الفولك في الحوامض بسهولة لأنها تكون أملاحاً مع

مجموعة الأمينو فيه ويكون ثابتاً تجاه الحرارة سواء وجد في محيط متعادل أو حامضي أو قاعدي لذلك لا يفقد الفيتامين بالطبخ إلا أنه يتلف بالضوء. لقد استدل على أن فقدان هذا الفيتامين في الحليب يعود لعملية الأكسدة. توازي هذه العملية نكوص Dagradation حامض الإسكوربك. وتؤدي إضافة حامض الإسكوربك إلى ثبات حامض الفولك.

1-4-8-1 التخليق الحيوي

يستخدم (I) Guanosinetriphosphat مباشرة لتخليق الـ pteridine كما في الشكل (1-24). يحفز أنزيم البكتريا E.Coli (الوزن الجزيئي 210000) فتح الحلقة وفقدان C-8 للبيورين بشكل فورمات وتكوين (17) triphosphate Dihydronopterin

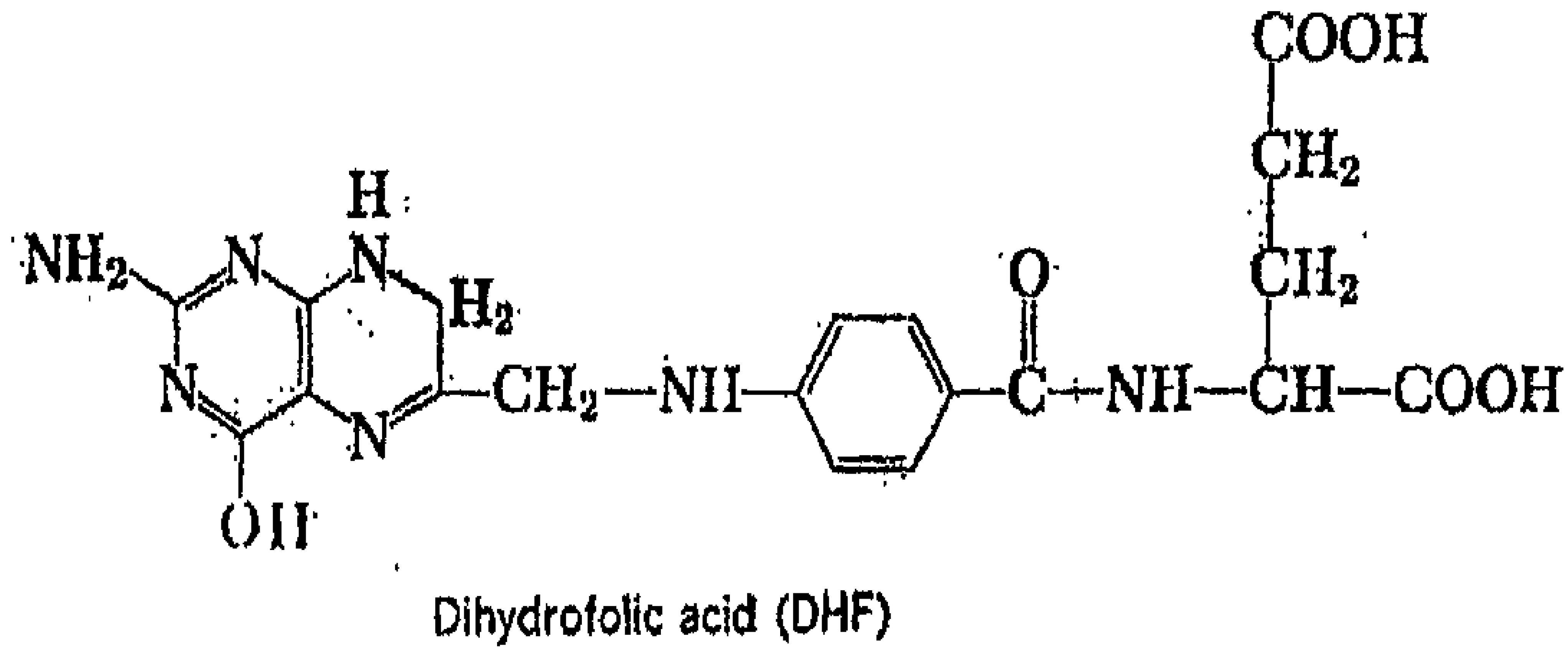
إن المركبين الوسطيين المفترضين II وIII لم يكن عزلها. يستطيع 2-Amino 4- Hydroxy-6 hydroxymethyl dihydropteridine (V) واستر البيروفوسفات (VI) أن يعملا بمثابة سلف لحامض Dihydropteroic (VII) تتنافس مركبات Sulfonamides مع حامض p-Aminobenzoic في تفاعل اتزان لتكوين (711). يتكون حامض p Aminobenzoic- من الحامض Chorismic ويكون الكلوتامين مصدر مجموعة الامينو فيه.



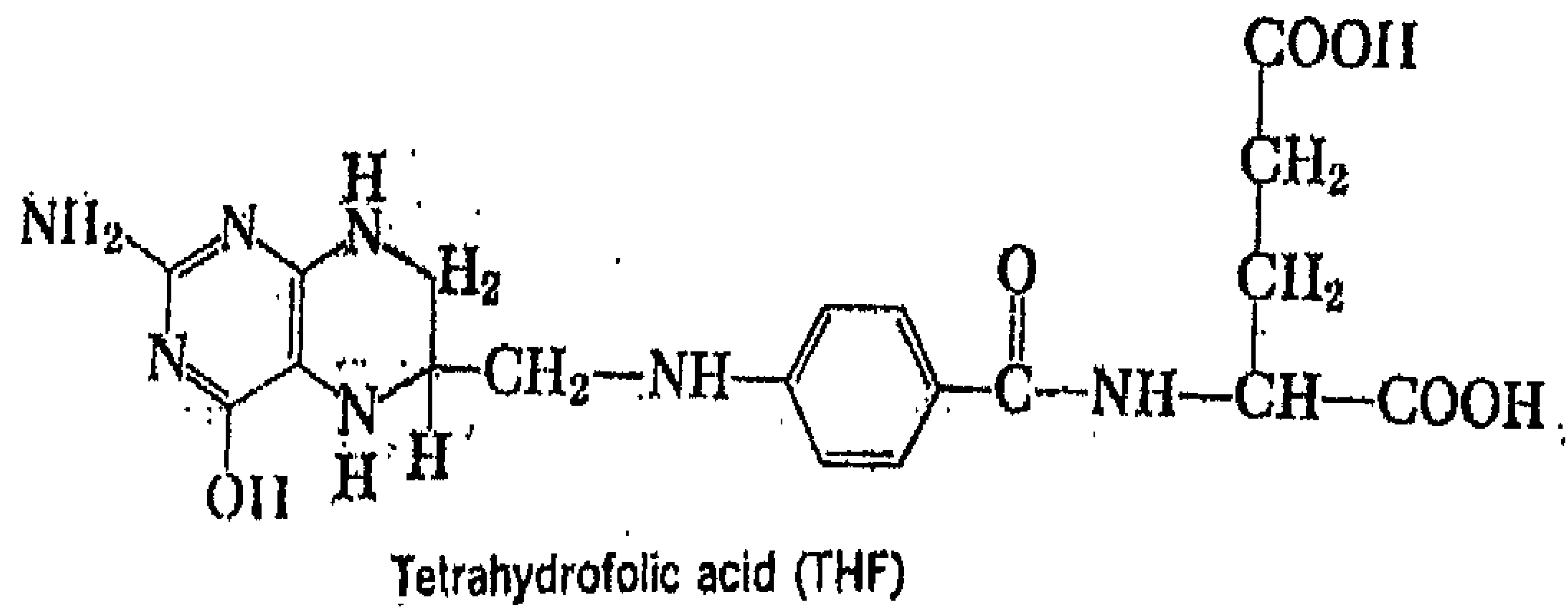
شكل 1-24 المخطط العام لتخليق حامض الفولك. ترمز P إلى مجموعة الفسفات وبذلك يشير PPP إلى ثلاثي الفسفات وPP إلى ثنائي الفسفات

1-4-8-2 الوظيفة الكيميائية الحياتية

على الرغم من أن الفيتامين هو حامض الفولك إلا أن نواتج اختزاله تمثل صيغ التميم الأنزيمية الحقيقية يختزل الأنزيم l.Folate reductase حامض الفولك إلى حامض ثنائي هدروفولك DHF، ويختزل هذا المركب إلى THF بواسطة الأنزيم Dihydrofolic reductase ويمثل NADPH العامل المختزل في كلا التفاعلين.



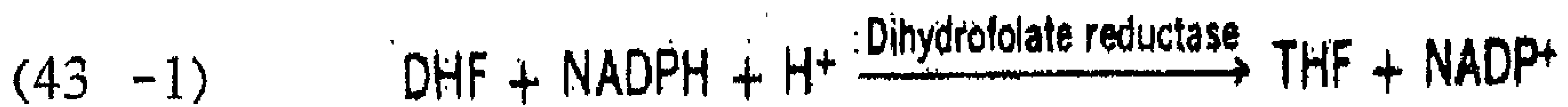
Dihydrofolic acid (DHF)



Tetrahydrofolic acid (THF)

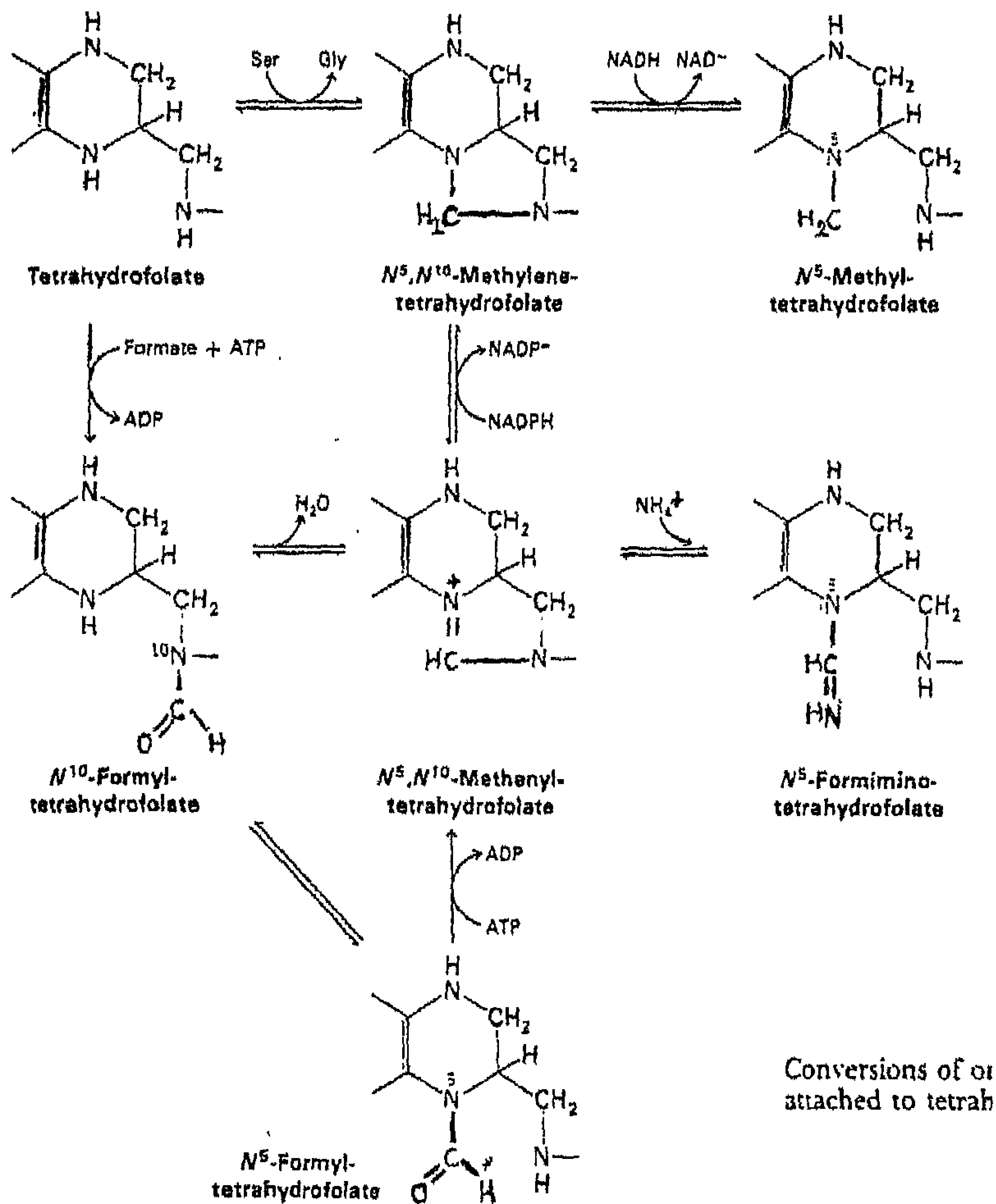


$$F(Folate) + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{Folate reductase}} DHF + NADP^+ \quad (42-1)$$



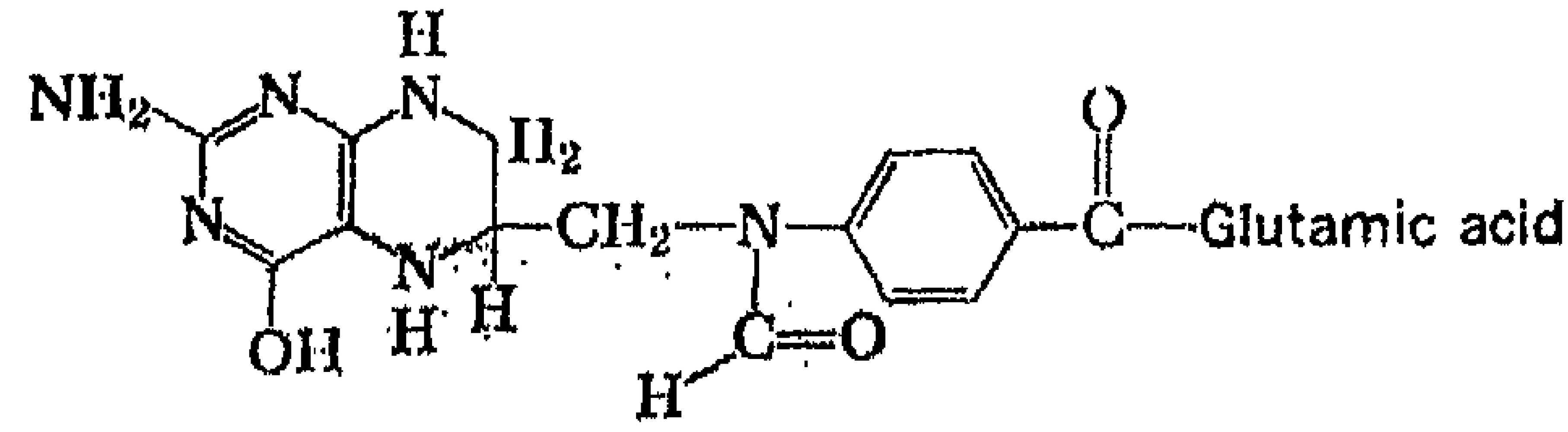
$$DHF + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{Dihydrofolate reductase}} THF + NADP^+ \quad (43-1)$$

الوظيفة الأساسية لرباعي هيدرو حامض الفولك THF نقل وحدة كاربون مثيل ($-CH_3$) أو مثيلين ($-CHO$) أو فورميل ($CHO-$) أو مثينيل ($-CH=$) كما في الشكل (1-25) تستخدم الفورمات في تخليق البريميدينات والبيورينات والسرين والكليسين أن خطوات عملية نقل الفورمات معقدة ولكنها تبتدىء بتنشيط حامض الفورمك (معادلة1-44).



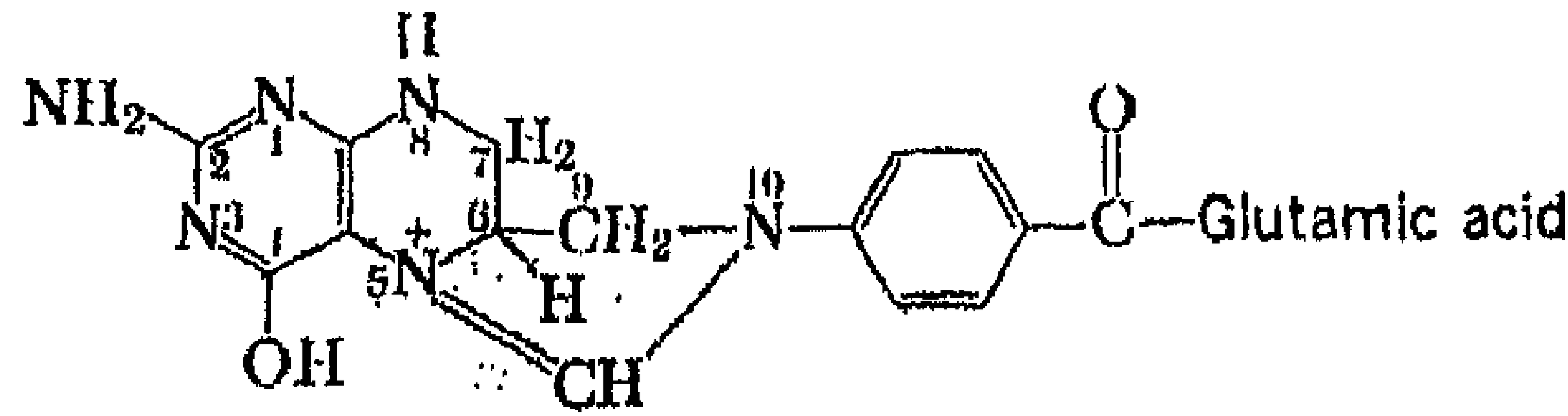
شكل 1-25 تحولات الوحدات أحادية الكربون المرتبطة برباعي هدروحامض الفولك

يعاني Formly THF _ N^{10} إغلاق حلقي لتكوين $N^{5.10}$-methyl THF .



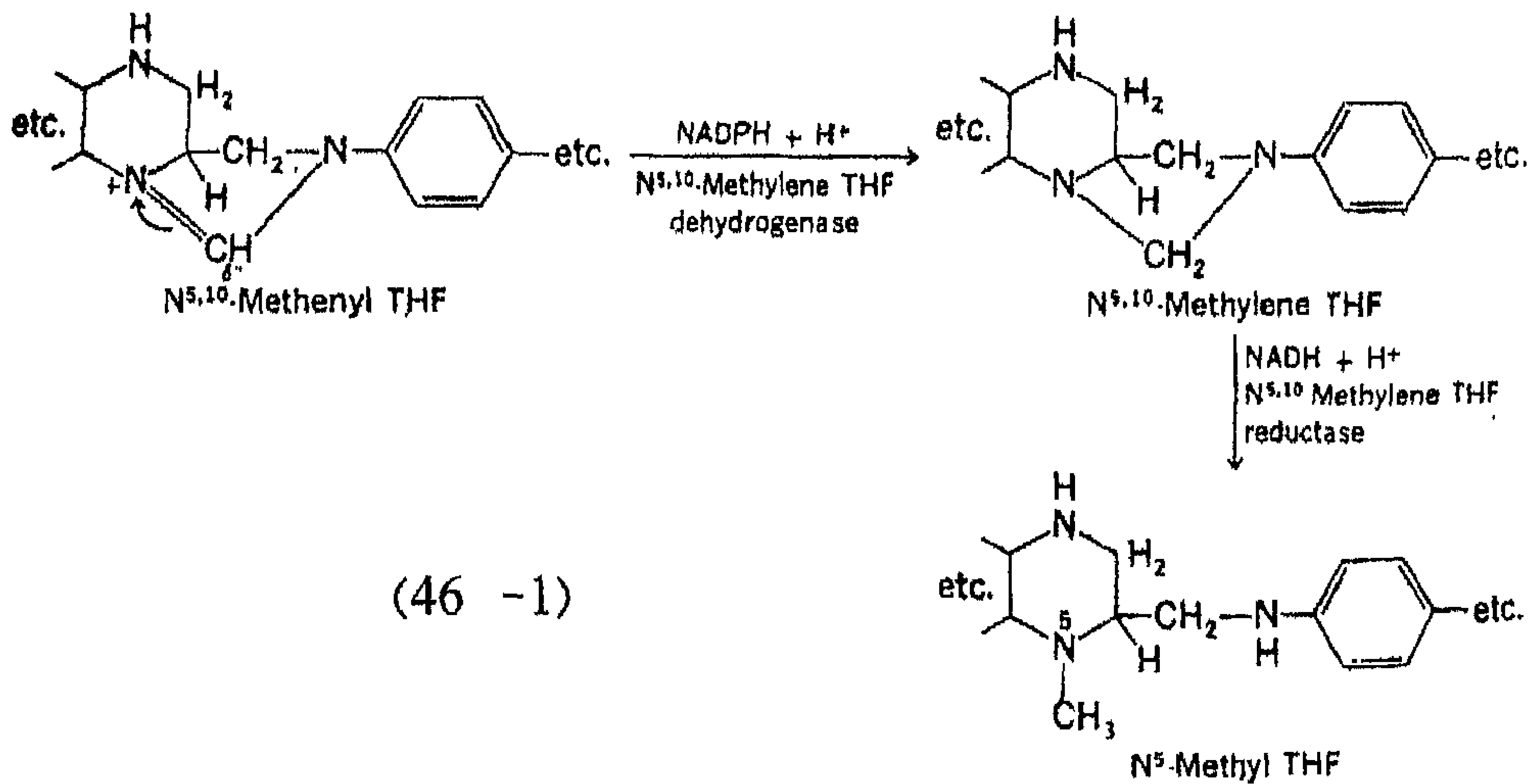
N^{10}-Formyl THF

H^+ ⇅ $N^{5,10}$-Methylenyl THF cyclohydrolase



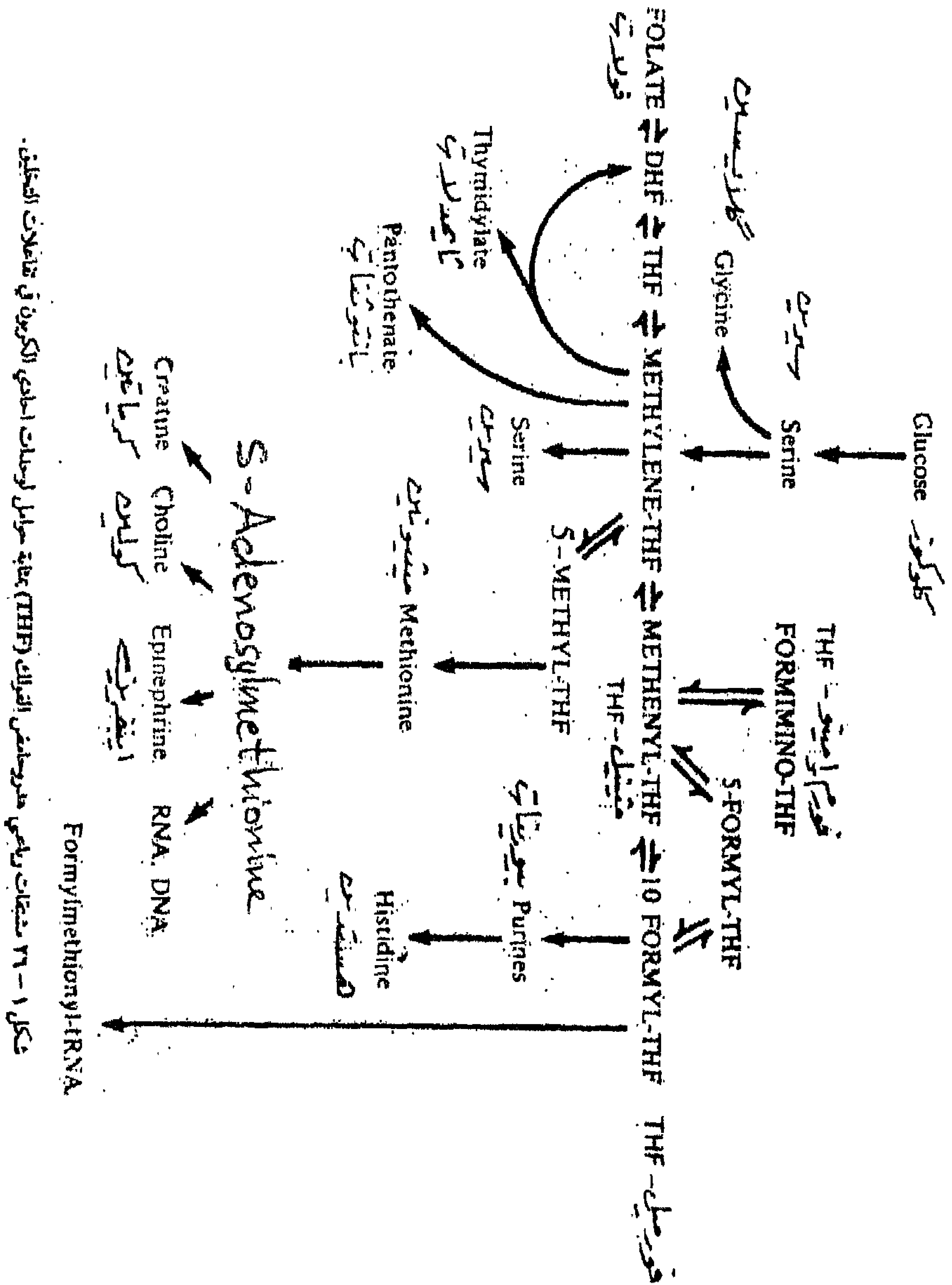
$N^{5,10}$-Methenyl THF

ويختزل المركب الناتج بواسطة NADPH وأنزيم Dehydrogenase متخصص:



(46 -1)

يوضح الشكل التالي (شكل 1-26) مشتقات THF حوامل لنقل وحدات أحادية الكربون في تفاعلات تخليق مختلفة.



شكل ١ – ٢٦ مشتقات رباعي هيدروحامض الفوليك (THF) بمثابة حوامل لوحدات احادي الكربون في تفاعلات التخليق.

يؤدي نقص حامض الفوليك إلى تغير في مكونات الدم الخلوية ونشوء نوع مميز من فقر الدم يسمى بـ Megaloblastic anemia

1-4-8-3 تعيين حامض الفولك

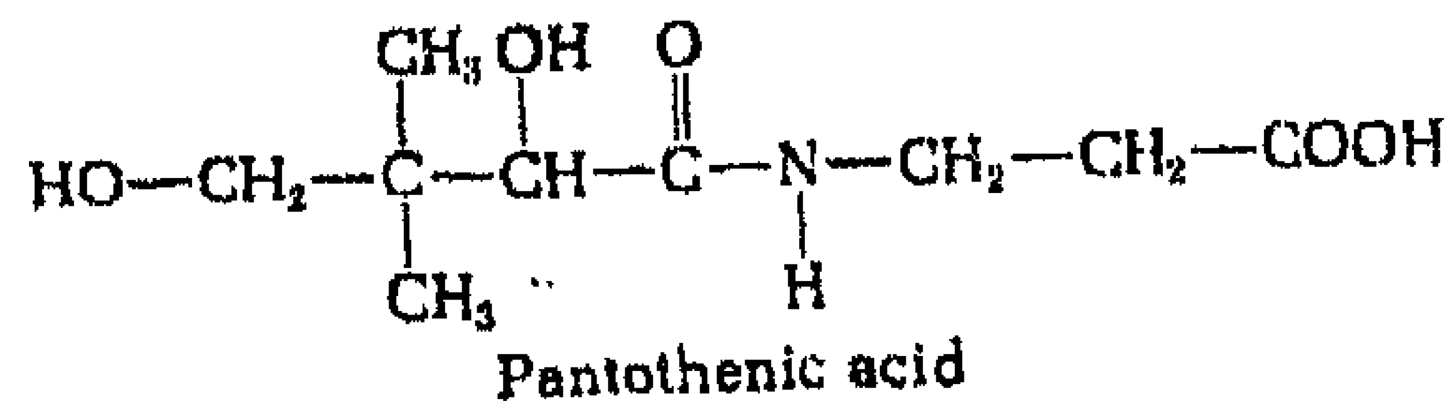
يمكن تعيين حامض الفولك باستخدام الطرق الحيوية ويفضل استخدام الأحياء المجهرية ولقد تم استخدام البتكيريا والخمائر والاعفان لهذا الغرض ومن أفضل ما استخدم S.Faecalis وL.Casei تفضل الطرق الحيوية على الكيميائية لأن الأخيرة تفتقر إلى الخصوصية ، ولقد استخدمت امكانية شطرالحامض Pteroylglutamic لإعطاء الحامض Aminobenzoic- أساس العديد من الطرق الكيميائية لتقدير حامض الفولك. وتستخدم هذه الطرق لتعيين الفيتامين في المنتجات الدوائية عالية الفعالية.

لقد استخدم كذلك تألق أحد نواتج أكسدة الحامض pteroylglutamic (2- Amino-4hydroxypteridin -6-Carboxylicacid)عند تشعيعه عند 365 نانوميتر. ولتقدير رباعي هدروحامض الفولك THF يتم التشعيع عند 330 نانوميتر ثم تقاس كثافة تألق الجزيئة المهيجة عند 350 نانوميتر ويمكن بهذه الطريقة قياس تراكيز واطئة بحدود 2×10^{-4} مايكرومول/مللتر.

أمكن تعيين حامض الفولك بوجود فيتامينات أخرى بتعيين ارتفاع امواج البولاروكرافي في وسط قاعدي. وعند استخدام طرق الكروماتوكرافي سوية مع الطرق الحيوية المجهرية يمكن تعيين متماثلات حامض الفولك المختلفة عنه بمجموعة وظيفية واحدة.

1-4-9 حامض البنتوثنك pantothenic acid

تم اكتشاف حامض البنتوثنك عامل نمو للخمائر ثم وجد بأنه فيتامين للإنسان، ويكون فعالا بصيغته (+) فقط



Pantothenic acid

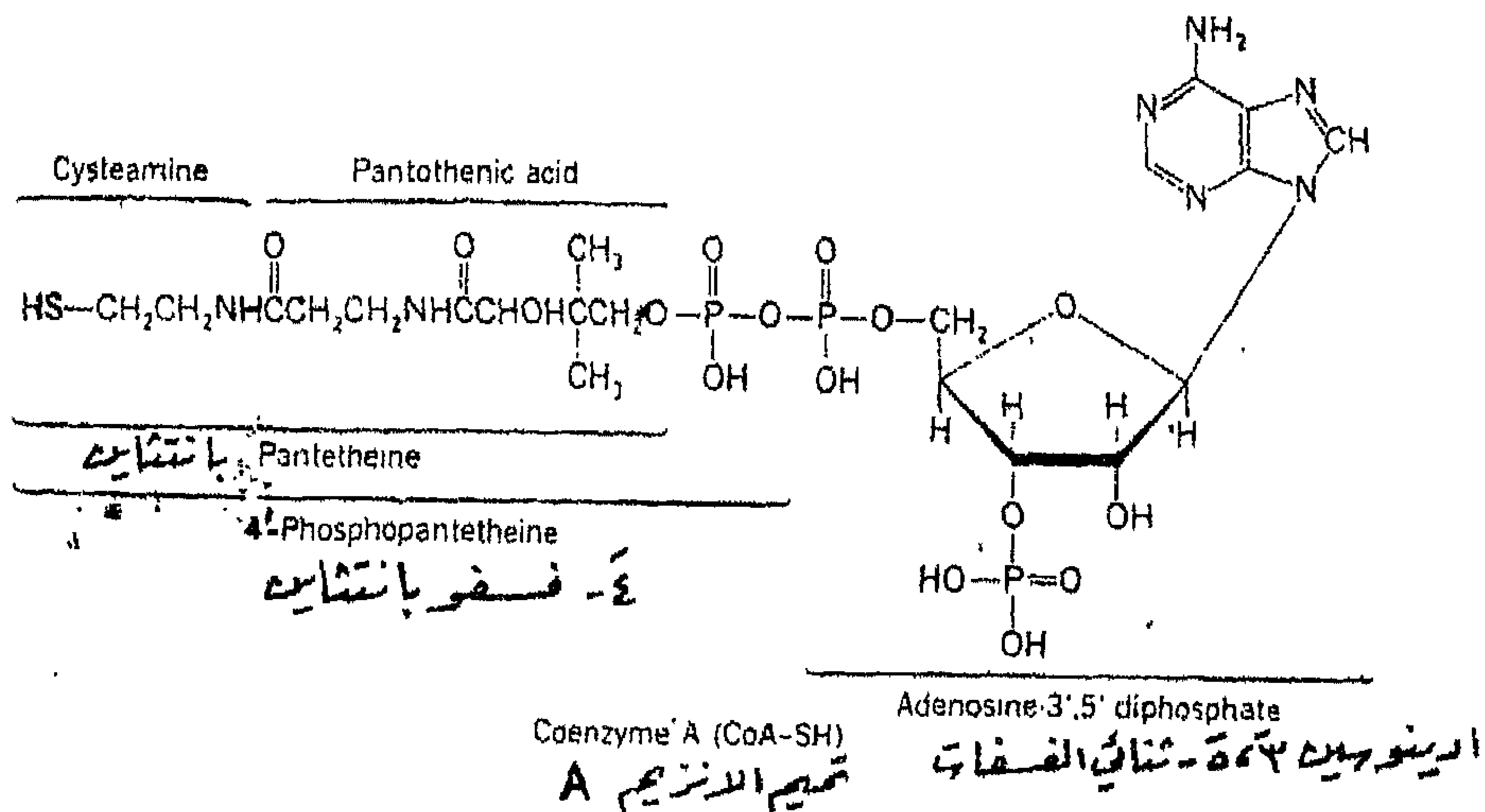
[D(+)-α, γ-dihydroxy-β, β-dimethylbutyryl-β-alanine]

يسمى الكحول المقابل لحامض البنتوثنك باسم Pantothenol ويعمل أيضا كفيتامين إلا أنه لا يظهر تأثيرا في نمو الأحياء المجهرية. حامض البنتوثنك زيت لزج يذوب بسهولة في الماء والاستون والكحول المطلق Absolute alcohol، يتبلور بشكل ملح الكالسيوم ويستخدم بهذه الصيغة في تحضيرات الفيتامين. يكون حامض البنتوثنك في المحاليل المتعادلة ثابتا تجاه الضوء وأوكسجين الهواء الجوي إلا أنه حساس للحرارة ويتحلل مائيا إلى B- Alanine ولاكتون حامض البانتوك pantoic وكذلك الحال في المحاليل الحامضية أو القاعدية.

يفقد 10٪ من حامض البنتوثنك عند تعقيم الحليب، وعند طبخ الخضراوات يتراوح ما يفقد منه بين 10 و30٪

1-4-9-1 وجوده

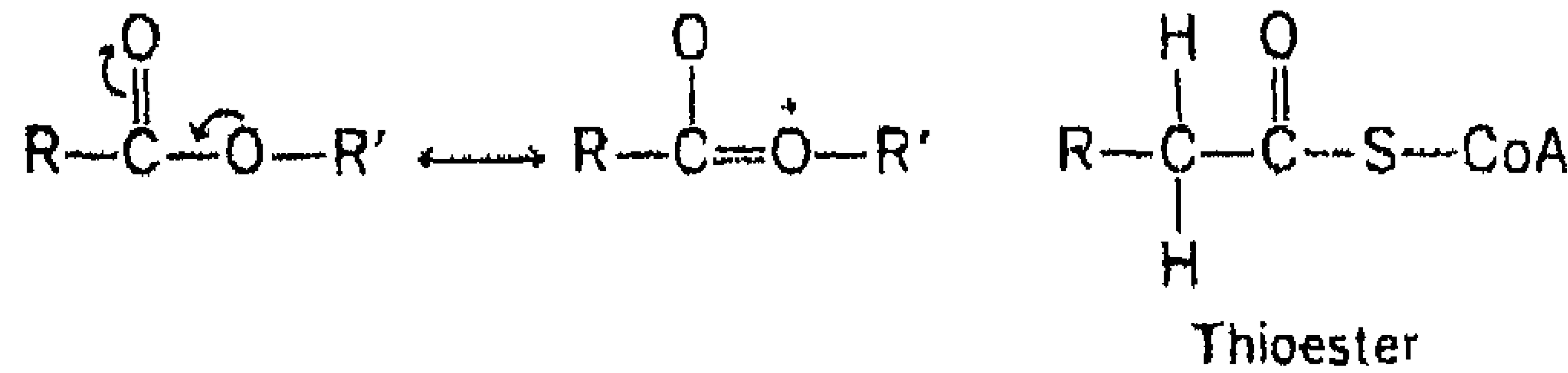
يوجد حامض البنتوثنك في الطبيعة بوصفه جزءا من تركيب تميم الأنزيم والبروتين الناقل للاسيل Acy Carrier Protein, تم عزل تميم الأنزيم A(Coenyme A) وتعيين تركيبه في أواخر الأربعينات من قبل F.Lipmann



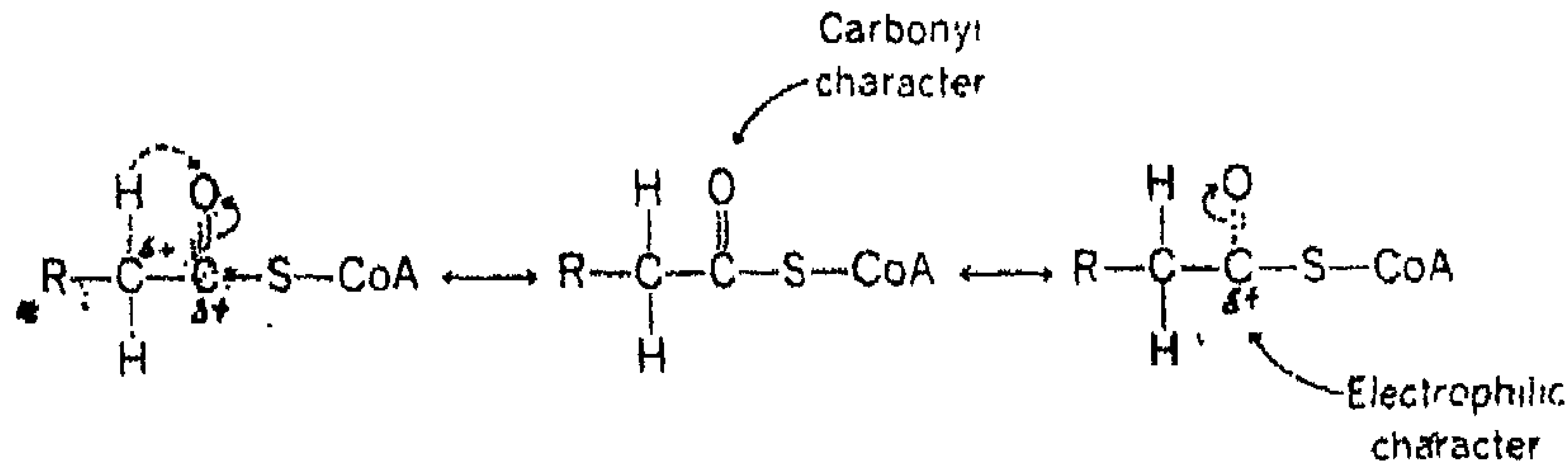
2-9-4-1 الوظيفة الكيميائية الحياتية

يعمل تميم الأنـزيم Coenzyme)A) بمثابـة ناقـل لمجـاميع الاسيل ويـشجع تكـاثف Condensation ثايواسـترات الاسـيل Acythioesters. تـرتبط مجـاميع الاسيل بتميم الأنـزيم مـن خـلال مجموعـة الثـايول للتمـيم.-وتتميـز اسـترات الثـايول المتكونة من تميم الأنزيم A والحوامض الكـربكـوكسيلية بخواص فريدة يعـزى إليها الدورالذي يلعبه التميم الأنزيمي A في الكيمياء الحياتية. ويمكن فهم هذه الخواص بصورة جيدة عند مقارنتها ببعض خواص استرات الأوكسجين. يمكن كتابـة صـيغة رنـين Resonance-form لاسـتر اوكـسجيني بحيـث تكـون ذرة اوكسجين الاسترو موجبة الشحنة وترتبط باصرة مزدوجة إلى كربون مجموعة الكربوكسيل.

أما الكبريت فإنه لا يعطـي الكتروناته بسهولة لتكـوين الاصـرة المزدوجـة ولهذا لا تظهـر اسـترات الكبريـت صـيغ الـرنين الـتي يمكـن كتابتهـا للاسـتر الاوكسجيني وعوضا عن ذلك،

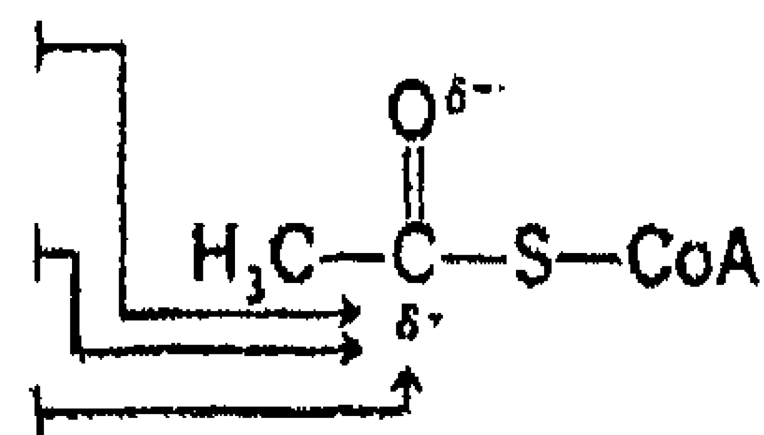


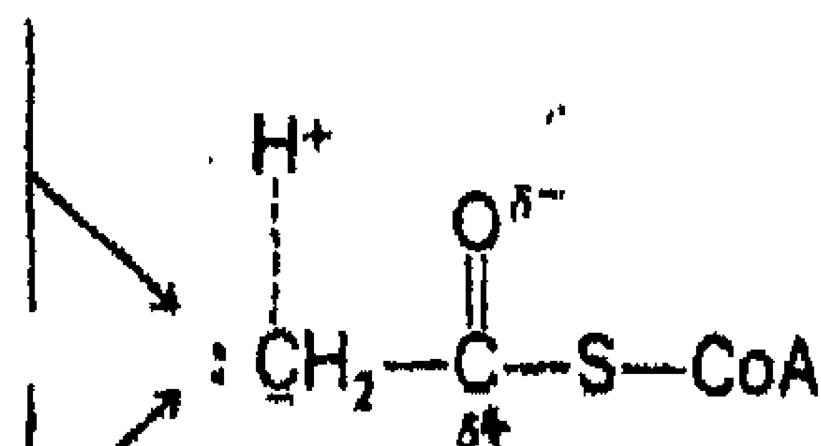
تظهـر اسـترات الثـايول صـفات الكربـونيلات حيـث يمتلـك الكربـون الكربوكسيلي شحنة موجبة جزيئة فيما يمتلك الأوكسجين شحنة سالبة جزئية ونظرا للشحنة الموجبة الجزيئة على



ذرة الكربون الكربوكسيلي، تميل ذرة الهدروجين على ذرة الكربون-الفا المجاورة، إلى التفارق Dissociation بشكل بروتون تاركة وراءها شحنة سالبة جزيئة على ذرة الكربون-الفا. يستنتج مما تقدم الخاصية الالكتروفيلية Electrophilic لكربون مجموعة الكربوكسيل في استرات الثايول والخاصية النيوكليوفيلية Nucleophilic لذرة الكاربون- الفا. اضف إلى ذلك عدم قدرة استرات الثايول على امتلاك صيغ رنينية كما كتب للاسترات الأوكسجينية، مما يجعل الجزيئة أقل استقرارا وتتحرر كمية كبيرة من الطاقة الحرة –AC عند تحللها المائي.

إن النيوكليوفيلات مثل الامينات والامونيا والماء ومركبات الثايول وحامض الفسفورك تستطيع أن تهاج الموقع الإلكتروني وتزيح المجموعة (S- CoA -S) أما الإلكتروفيلات مثل CO_2 Acyl CoA والمعقد Carboxylated biotin Carboxyl Carrier Protein CO_2 BCCP (انظر ١-4-7-3) فإنها تهاجم الموقع النيوكليوفيلي

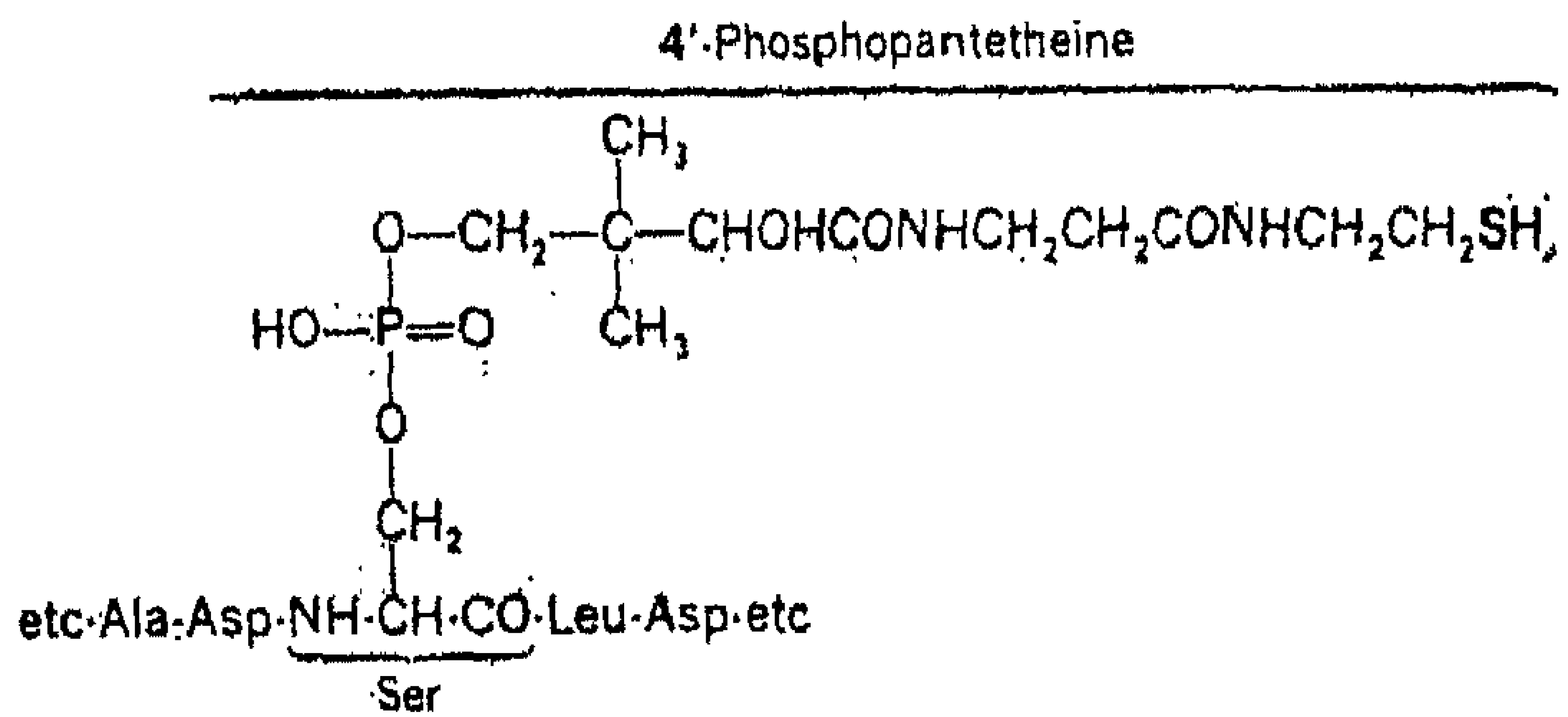




شكل 1-27 دور الاستيل تميم الأنزيم A(Acetyl CoA)

كمركب نيوكليوفيلي والكتروفيلي

يلعب البروتين الثابت تجاه الحرارة والمسمى البروتين الناقل للاسيل Acylcarrier protein ACP دوراً مهماً في تخليق الحوامض الدهنية ومن ميزات هذا البروتين الوحدة 4 phosphopantetheine– المرتبطة تساهميا إلى مجموعة الهدروكسيل لثمالة سرين في البروتين. ونظرا لوجود البنتثين Pantetheine، تستطيع الجزيئة أن تعمل بمثابة ناقل لمجموعة الاسيل بطريقة مماثلة إلى تميم A من خلال تكوين استر الثايول مع مجموعة السلفهدريل (SH–) للبروتين



شكل 1–28 ارتباط المركب 4-Phophopantethine بثمالة سرين للبروتين الناقل للأسيل ACP

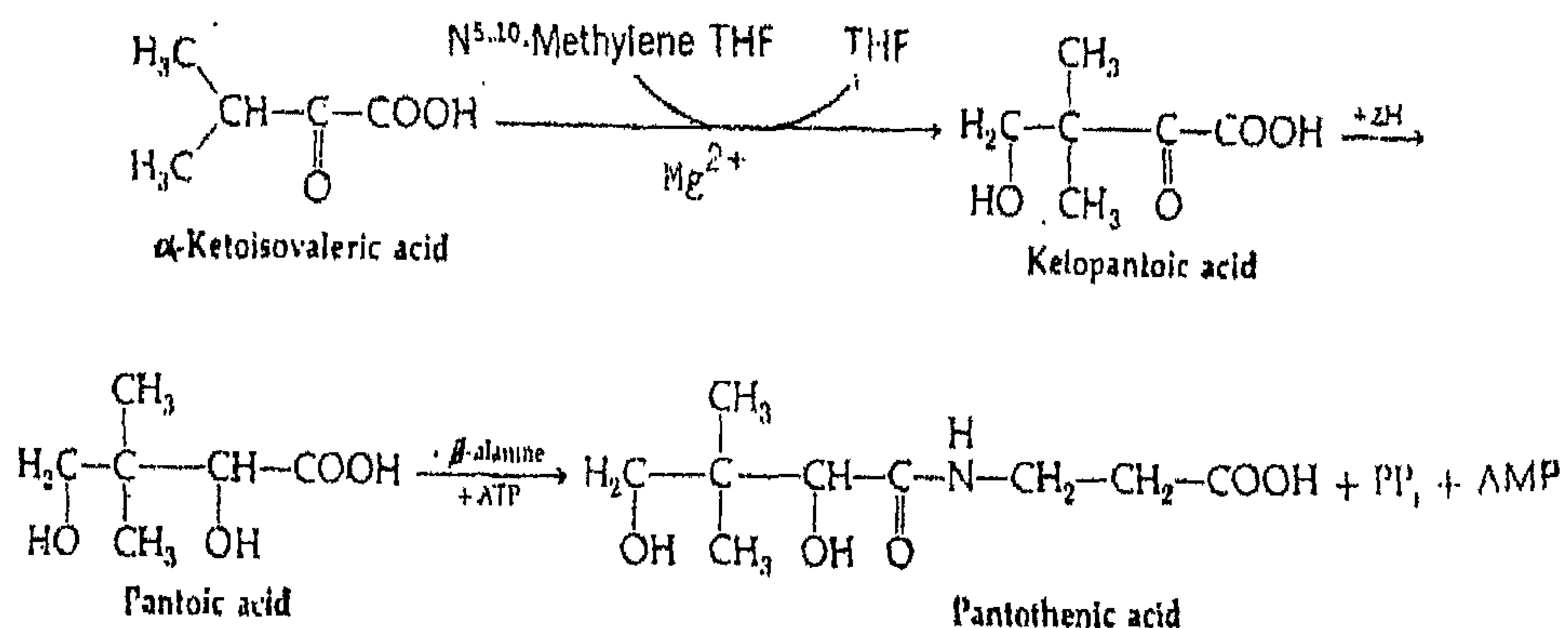
يوجد البروتين الناقل للاسيل ACP بحالة ذائبة في النباتات والبكتريا وأما في الأنسجة الحيوانية، فإن جزءاً من الجزيئة ACP يرتبط بصورة وثيقة بالمعقد الأنزيمي Fatty acid synthetase

1-4-9-3 التخليق الحيوي

يخلّق حامض البنتوثنك في النباتات الخضراء ومعظم الأحياء المجهرية بمسلك موضح أدناه (شكل 1–29). يبتديء التخليق بالحامض Keto isovaleric الذي يشكل أيضاً الجزيئة السلف precursor المباشرة للفالين. يتكون Alanine-B عند إزالة الكربوكسيل لحامض الإسبارتك أو نقل الامينو إلى

Malonic semialdehyde يحتوي أنزيم البكتريا E.Coli والمسمى Asprtate decarboxylase على ثمالة pyruvoyl مرتبطة تساهمياً. إن الطافرات التي تفتقر لهذا الأنزيم تحتاج إلى B- Alanine أو حامض البنتوثنك لنموها.

لم يلاحظ نقص لحامض البنتوثنك في الإنسان إلا أنه أحد المكونات الغذائية الأساسية لجميع الحيوانات ويعتقد بأن 5-10 ملغم منه يومياً تسد حاجة الجسم إليه، يعين حامض البنتوثنك باستخدام الأحياء المجهرية أو بتجارب الحيوانات.



شكل (1- 29) تخليق حامض البنتوثنك في خميرة الخبز ابتداء من الحامض

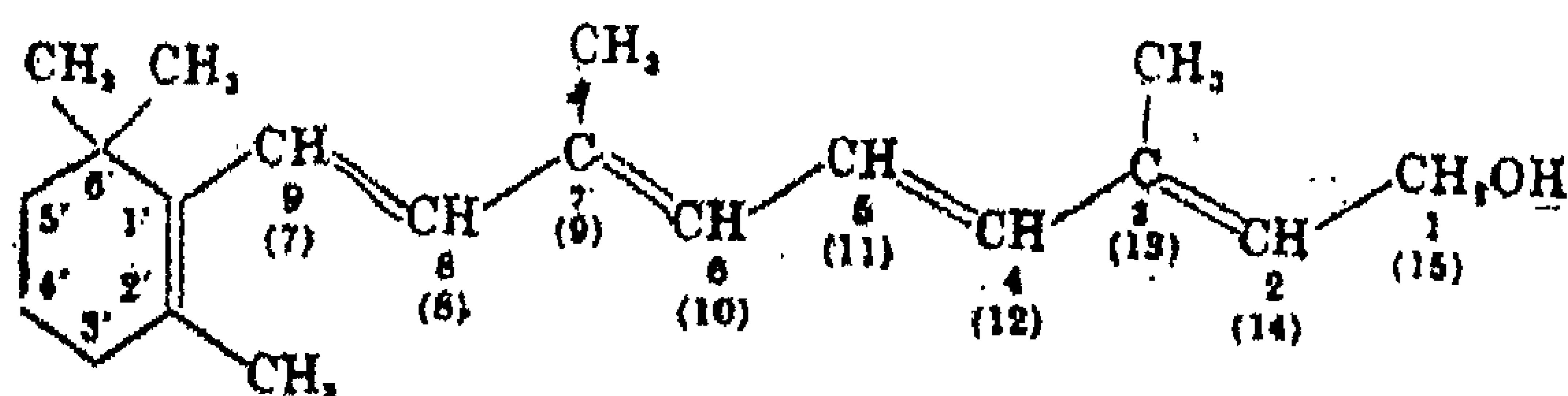
α – Ketoisovaleric

1-15 الفيتامينات الذائبة في الدهون

1-5-1 فيتامين A(Retionl)

وهو من الفيتامينات الذائبة في الدهون.

إن أفضل مركب طبيعي يمتلك فعالية فيتامين A هو ريتنول أو فيتامين A وهو كحول مشتق من هيدروكربون غير مشبع طويل السلسلة فتكون من وحدات الإيزوبرين:



retinol, vitamin A_1 alcohol

تحتوي السلسلة الجانبية على أربع أواصر مزدوجة متبادلة Conjugated وتكون هذه الأواصر متبادلة مع الاصرة المزدوجة للحلقة B- Ionone.

الصيغة الموجودة في الطبيعة لفيتامين A هي ترانس تام All-trans والصيغ المحضرة كيميائياً تكون كذلك ترانس تام وبما أن فيتامين A كحول، فإنه يستطيع تكوين استرات مع الأحماض الدهنية. إن أغلب الاسترات شيوعاً هي استرات الأحماض الدهنية طويلة السلسلة الهيدروكربونية.

تكون الاسترات أكثر ثباتاً تجاه العوامل الفيزيائية أو الكيميائية وكمثال الأوكسجين الجوي والحرارة ويحضر فيتامين A عادة بشكل استات أو بالمتات Palmitate.

يحتوي فيتامين A_2 على آصرة مزدوجة أخرى في الحلقة ويوجد في زيوت أكباد أسماك المياه العذبة.

إذا أكسدت مجموعة الكحول لفيتامين A، يتحول الأخير إلى الالدهايد أو الحامض وكلا الجزيئتين تظهر فعالية فيتامين A محدودة ذلك لأن حلقة B- Ionone الضرورية لفعالية فيتامين A لا تزال موجودة.

يمتلك فيتامين A($C_2OH_{30}O$) درجة انصهار 62-64°م وهو عديم الذوبان في الماء ولكن يمكن اذابته في المحاليل الغروية باستخدام المواد الفعالة سطحياً مثل توين Tween. يذوب فيتامين A بسهولة في الزيوت والدهون والبتروليوم الخفيفLight Petroleum والأثير والبنزين والميثانول والاستون والكلوروفورم ومذيبات الشحوم الأخرى. لفيتامين A خصوصية الامتصاص في المنطقة فوق النفسجية عند 328 نانوميتر. ويختلف موقع قمة الامتصاص قليلاً تبعاً للمذيب.

تتفاعل مجموعة الهيدروكسيل لفيتامين A مع الاستات والبالمتات لتكوين استرات:

استات فيتامين A1 ($C_{22}H_{32}O_2$):

تمتلك درجة انصهار 57-60°م ولها قابلية ذوبان مشابهة لفيتامين A1. امتصاصها للأشعة فوق البنفسجية مشابه تماماً لامتصاص فيتامين A1.

بالمتات فيتامين A ($C_{36}H_{60}O_2$)

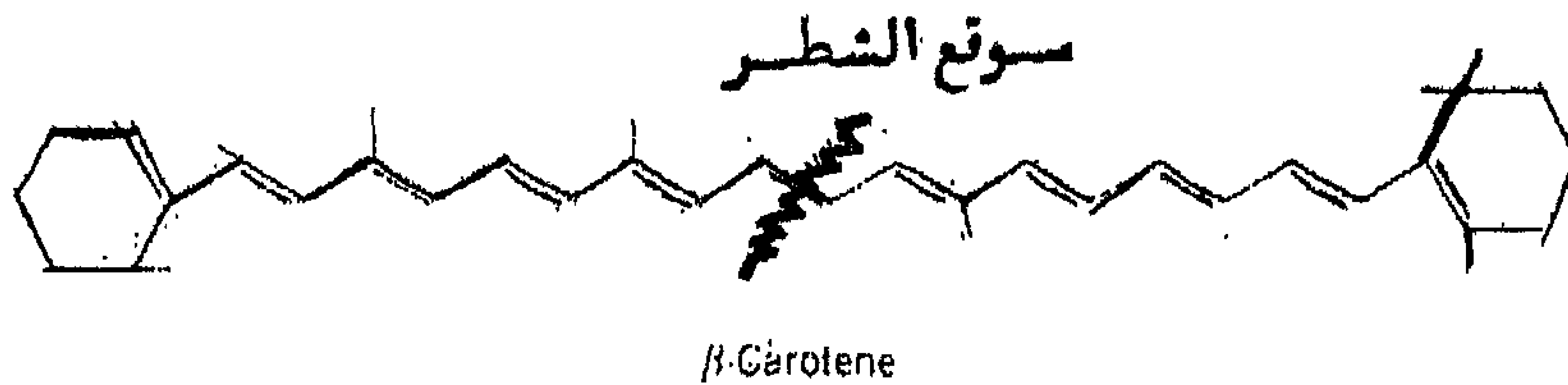
تمتلك درجة انصهار 28-29 م ولها ذوبان مشابه لفيتامين A وأستات فيتامين A.

اسلاف فيتامين A Vitamin A precursors

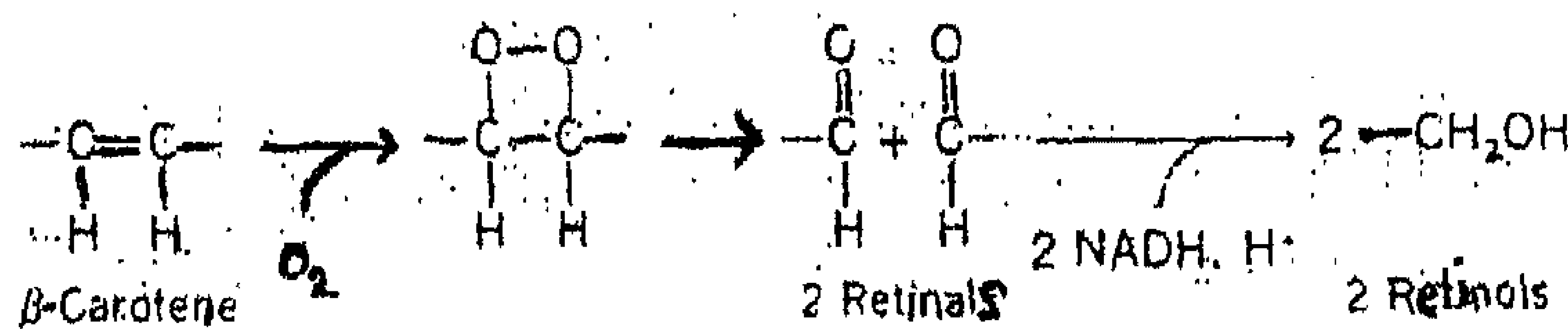
إن بعض الكاروتينويدات Carotenoids أسلاف لفيتامين A ويستطيع الحيوان والإنسان أن يكون فيتامين A من اسلاف الفيتامين المتناولة في الغذاء. ومن أهم أسلاف الفيتامين provitamins وCarotene وCarotene وCarotene و Cyptoxanthine. وتكون جميع أسلاف الفيتامين الموجودة في الطبيعة بصيغة ترانس تام All-trans. عندما يتحول B. Carotene إلى فيتامين A في الإنسان أو الحيوان تشطر الجزيئة في الوسط تماماً.



$$C_{40}H_{56} + 2H_2O \rightarrow 2C_{20}H_{29}OH$$



β-Carotene



1-5-1-1 وجوده

يخلق البيتا- الكاروتين مع الفا والكاما والكريتوزانتين Cryptoxanthine من قبل النباتات العليا ولا تستطيع الحيوانات ذلك ولهذا تكون الخضراوات الورقية الخضراء مصادر جيدة لاسلاف الفيتامين. ونظراً للخاصية رهابية الماء Hydrophobic توجد الكاروتينات كذلك في الحليب والمستودعات الدهنية للحيوانات وفي الكبد حيث يخزن ويحتوي زيت الكبد لسمك الماء العذب فيتامين A_2.

1-5-1-2 التحضير الصناعي لفيتامين A

يمكن إنتاج فيتامين A تجارياً بشكل مركزات فيتامين A Concentrates وذلك بالتقطير الجزئي من مصادر طبيعية وخصوصاً من زيوت كبد السمك كما يمكن الآن تحضير فيتامين A كيميائياً على الصعيد التجاري.

أ. عزل فيتامين A والكاروتينات من المصادر الطبيعية

يمكن عزل فيتامين A من زيوت أكباد الأسماك وذلك بصوبنة الزيوت أولاً في 3-4 مرات حجمها هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي (10٪) بمعزل عن الهواء (تحت النتروجين). تعزل المواد غير المصوبنة وتزال الستيرويدات ببلورتها من الميثانول. وينقى فيتامين A بالتقطير الحزئي في درجات حرارة وضغط منخفضين نسبياً (لإن فيتامين A غير مستقر في درجات الحرارة العالية). إن توفر فيتامين A المحضر كيميائياً جعل عزله من مصادر طبيعية ذا أهمية تأريخية فقط.

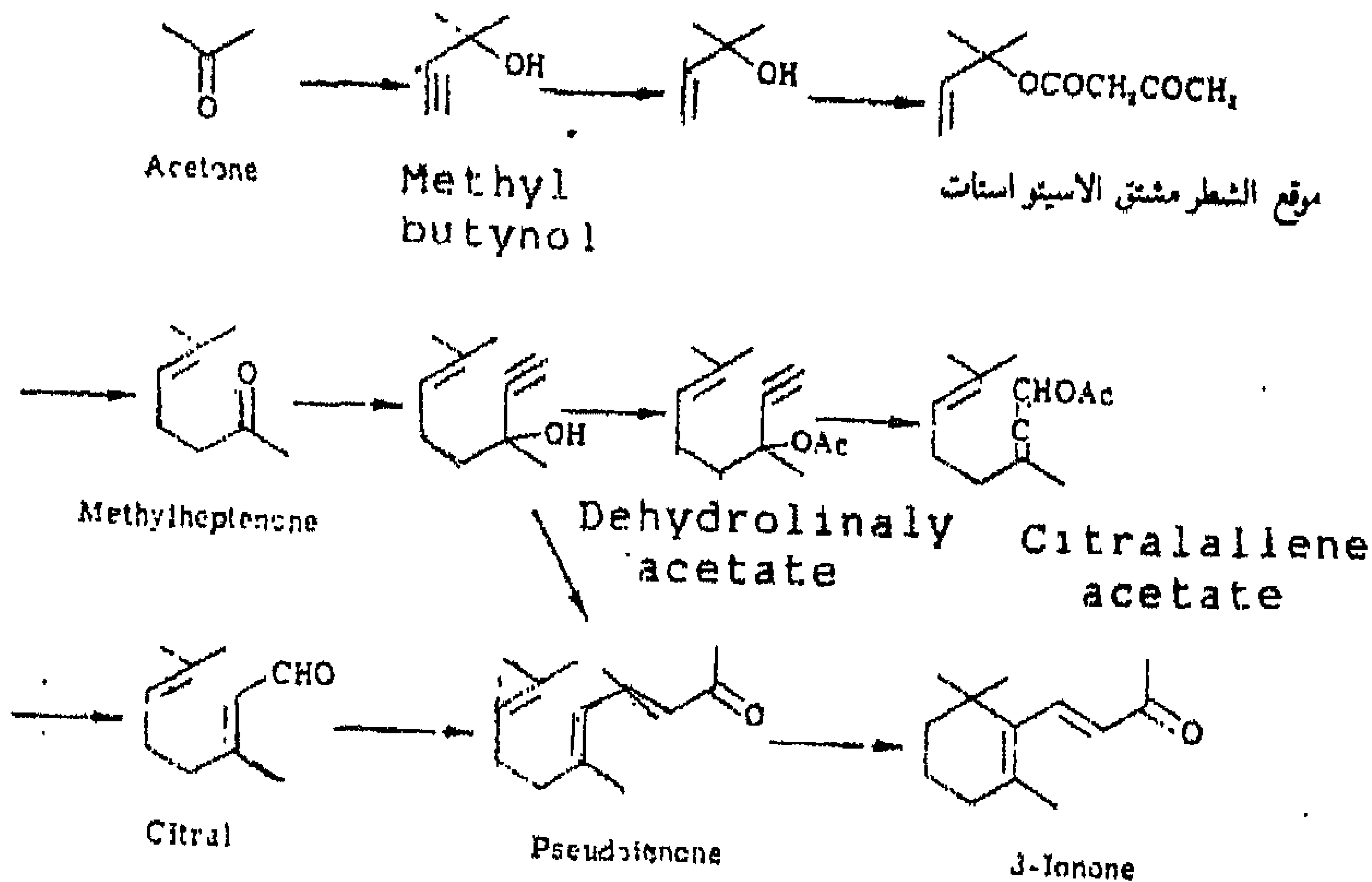
يمكن عزل الكاروتينات من الأوراق المجففة والجزر والجت Alfalfa وزيوت النخيل كما يمكن انتاج الكاروتينات بواسطة الأحياء المجهرية وكمثال من بعض سلالات Blakesled trispora

لقد استخدمت عدة طرق للعزل تتكون بصورة رئيسية من عملية استخلاص

بالمذيبات الحارة أوالباردة وذلك بغمر النسيج فيها أو مجانسته أو طحنه. تحتوي منتجات الجزر على مزيج من بيتا والفا- كاروتين فيما تحتوي خلاصات زيوت النخيل إضافة إلى ماذكر على كاروتينويدات أخرى مثل Xanthophylls

ب. تحضير فيتامين A

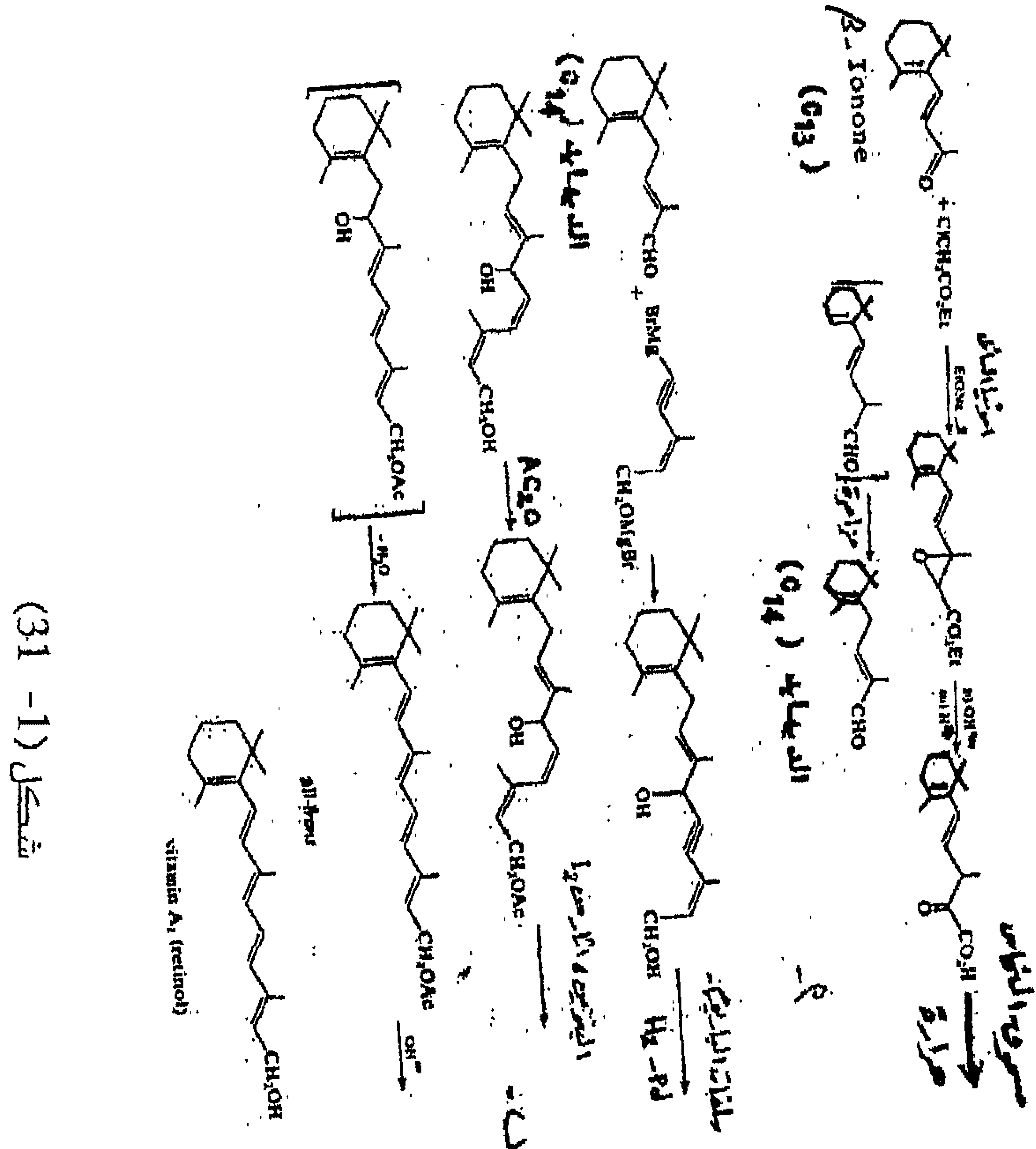
يعتمد التحضير الصناعي لفيتامين A والبيتا كاروتين B- Carotene وApocarotenoids على الحلقة β- Ionone يمكن تحضير هذا الكيتون أحادي الحلقة (C_{13}) الذي يشكل المنتوج الأساس في صناعة العطور، ابتداء بالاستون والذي يكشف مع الاستلين ثم يفاعل الناتج Methylbutynol مع Diketene لتكوين الاسيتواستات المقابل له (شكل 1-30) والذي يتحول إلى Methyl heptanone بالتحلل الحراري Pyrolysis. إن التكاثف اللاحق مع الاستلين والذي يلحق بالاستلة Acetylation يؤدي إلى Dehydrolinalyl وعند إعادة ترتيب الجزيئة يتكون Citralallene acetate الذي يتحلل مائياً بسهولة إلى Citral. يتكاثف السترال مع الاستون لإعطاء Pseudoiononone الذي يتحول إلى β- Ionone بتكوين الحلقة السداسية (شكل 1-30)



شكل 1-30 تحضير B - Ionone صناعياً ابتداء من الأستون

هناك عدة طرق لإطالة السلسلة الجانبية وتحويل β- Ionone إلى Vitamin A تتضمن أحدها إطالة β- Ionone ذرة كربون واحدة C_{13} → - - C_{13}- ثم تكاثف الالدهيد الناتج C_{14} مع مشتق بروميد المغنيسيوم للمركب

(1-01) yn -2-en-4- C_{13}.3. methylpent (C_6) لإعطاء Diol بلوري C_2O يمكن تحويله بسهولة إلى فيتامين A_1(شكل –1-31).

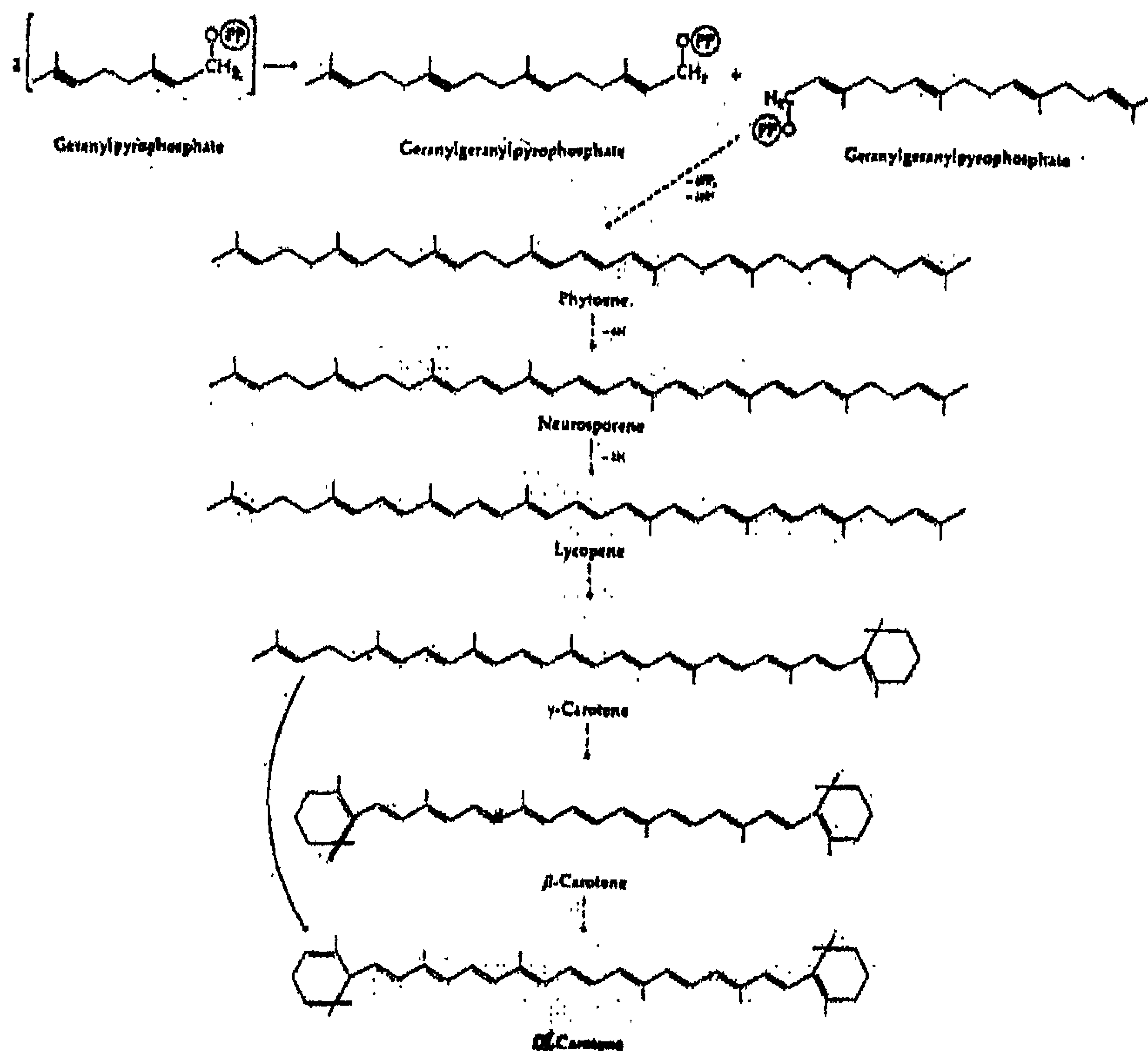


شكل (1- 31)

1-5-1-3 التخليق الحياتي للكاروتينويدات وريتنول

إن الكاروتينات والريتنول عبارة عن تربينات. يوضح الشكل (1-32) مسلك تخليقها الحياتي في النباتات. إن الجزيئات السلف المستخدمة في تخليق الستيرولات تستخدم أيضاً لتخليق الكاروتينات وهكذا بتكاثف جزيئتان من

ويتكاثف Geranlgernaly pyrophosphate يتكون pyrophosphate Geranyl جزيئتين منه يتكون phytoene. ويتكون أربع أواصر مزدوجة على مراحل، يتحول phytoene إلى Lycopene. وبتكوين الحلقة السداسية تتكون الكاروتينات (شكل 1-32).



شكل (1-32) التخليق الحيوي للكاروتينات (المصدر 12)

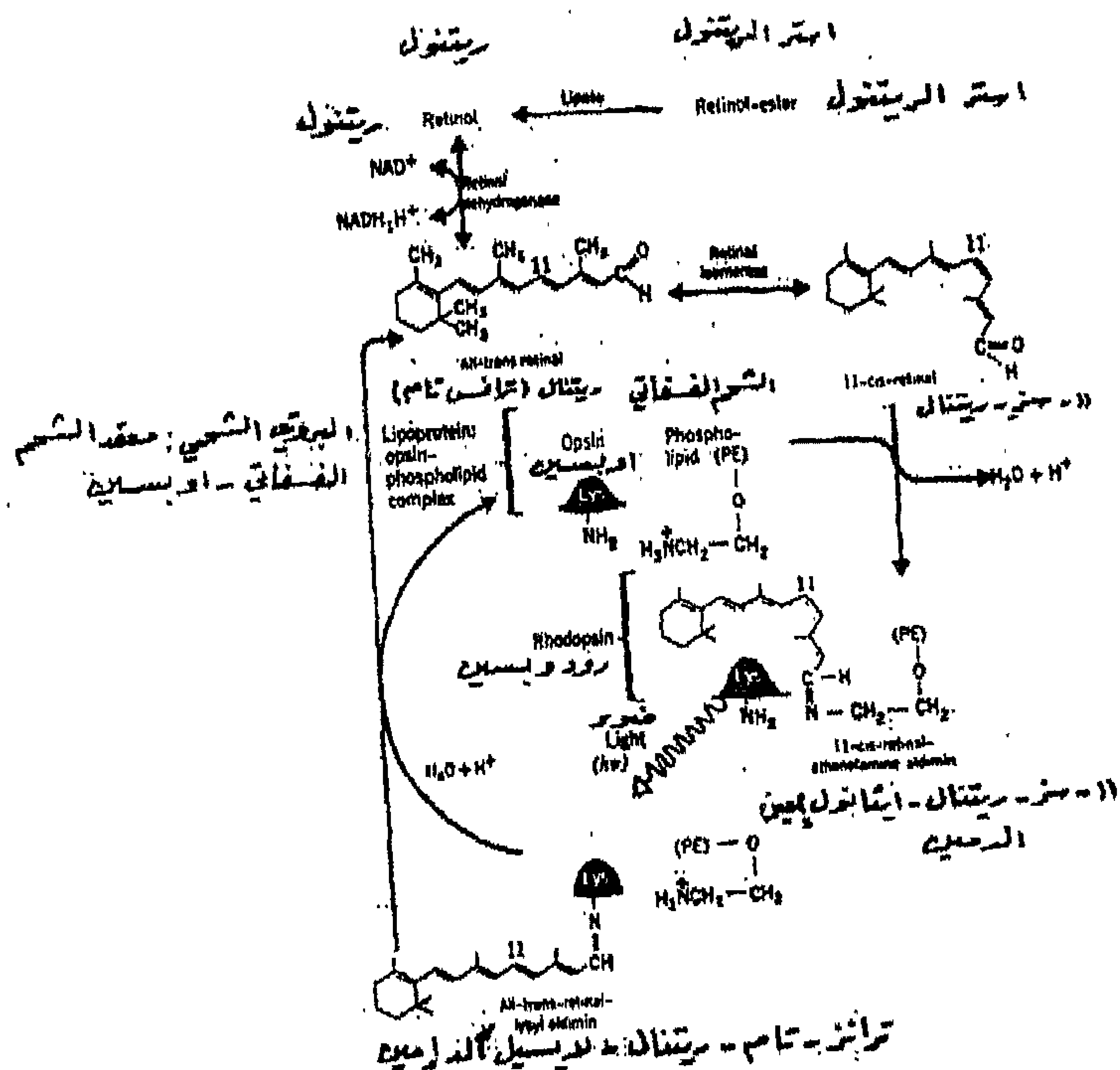
استر الريتنول ريتنول الشحم الفسفاتي ريتنال (ترانس تام) البروتين الشحمي: معقد الشحم الفسفاتي- اوبسين رودوبسين ضوء ضوء 11- ريتنال- إيثانول إمين الدمين تزانز-تام- ريتنال- لا يسيل الدإمين البروتين الشحمي: مقعد الشحم الفسفاتي- اويسين.

1-5-1-5 فيتامين A وتغذية الإنسان

لفيتامين A وظائف متعددة فهو جوهري ليس فقط للنظر (شكل 1-33) وإنما للنمو ولتطور الأنسجة الظهارية Epithelial ولتطور وسلامة الأنسجة الهيكلية Skeletal tissue وللإنطاف Spermatogenensis ولتطور المشيمة والحفاظ عليها.

يعبر عن فعالية فيتامين A في الأغذية كمكافئات الريتنول Retinol equivalent,

RE يمثل RE مايكروغراماً واحداً من الريتنول أو 6 مايكروغرامات من بيتا- كاروتين. يؤدي الأوكسجين الجوي إلى أكسدة الأواصر المزدوجة في الريتنول والكاروتينات وبالتالي فقدان فعالية الفيتامين.



شكل 1-33

يوضح شكل (1-33) دور فيتامين A في دورة النظر، يتراكم الريتنول في خلايا القضبان Rods للقرينة بشكل إسترات. يؤكسد الريتنول في القضبان بانزيم خاص. Retinol dehyrogenase إلى All-trans- retinal الذي يتحول إلى Cis—11 retinal بالأنزيم Retinal isomerase. في الظلام، يقترن هذا الالدهيد مع بروتين شحمي وهو المعقد opsin phospholipid وبذلك يتكون الرودوبسين Rhodopsin الحساس للضوء. يكون Cis-retinal-11 قاعدة Schiff مع (PE) phosphatidylethanolamine وأواصر هدروفوبية مع الاوبسين Opsin على التوالي. عندما يسقط الضوء على الرودوبسين، يتحول Cis- retinal-11 إلى All- trans- phospholipid الذي لا يستطيع تكوين أواصر رهابية الماء مع المعقد Opsin- phospholipid. يكون All- trans- retinal بعد ذلك قاعدة Schiff مع مجموعة لايسين في الاوبسين وهذا يتحلل ما ثياً بعد ذلك إلى All- trans- retinal والمعقد Opsin-phospholipd

وفي الأغذية الطبيعية تحمى هذه المركبات من الضرر لوجود مضادات للأكسدة Antioxidants بصورة طبيعية فيها مثل فيتامين E.

عند الأكسدة الذاتية للدهون الصالحة للأكل، يتلف فيتامين A الموجود فيها، كما يتلف فيتامين A كلياً عند تصلد Hardening الدهون وكمثال عند هدرجة Hydrogenation زيوت الأسماك.

يجب الإبتعاد عن تجفاف الأغذية النباتية في ضوء الشمس المباشر لأن فقدان الكاروتين قد يكون كبيراً بوجود O_2 تحت درجات حرارة عالية. غالباً ما يصاحب تلف فيتامين A وإسلافه، أكسدة الدهون أنزيمياً وهذا ما يحصل عند تجفاف الأغذية إذا لم يسبق تثبيط الأنزيمات فيها.

إن محتوى الفواكه والخضراوات من فيتامين A والكاروتينات لا يتأثر بدرجة كبيرة بالمعاملات المنزلية الإعتيادية للأغذية كما لا يؤثر فيها الحفظ في الزجاجات أو العلب.

تعتمد إستفادة الجسم من الفتيامين والكاروتين الموجود في الغذاء على محتوى الأخير من الدهون. فعند تناول كميات كبيرة من الدهون، تكون درجة الامتصاص أعلى مما في غيابها ويكون التأثير أكبر للكاروتينات منه لفيتامين A نفسه. أن الامتصاص قليل جداً من الخضراوات النيئة فمثلا يطرح 98٪ من كاروتينات الجزر والموجودة فيه بكميات كبيرة. وعند وجود اللسثين وعوامل إستحلاب Emulsifers أخرى، يمتص الجسم فيتامين A وإسلافه بصورة أفضل نظراً لتوزيعه المنتظم كما أن إمتصاص الكاروتين يزداد بوجود الصفراء والبروتين في الأغذية.

2-5-1 فيتامينات D

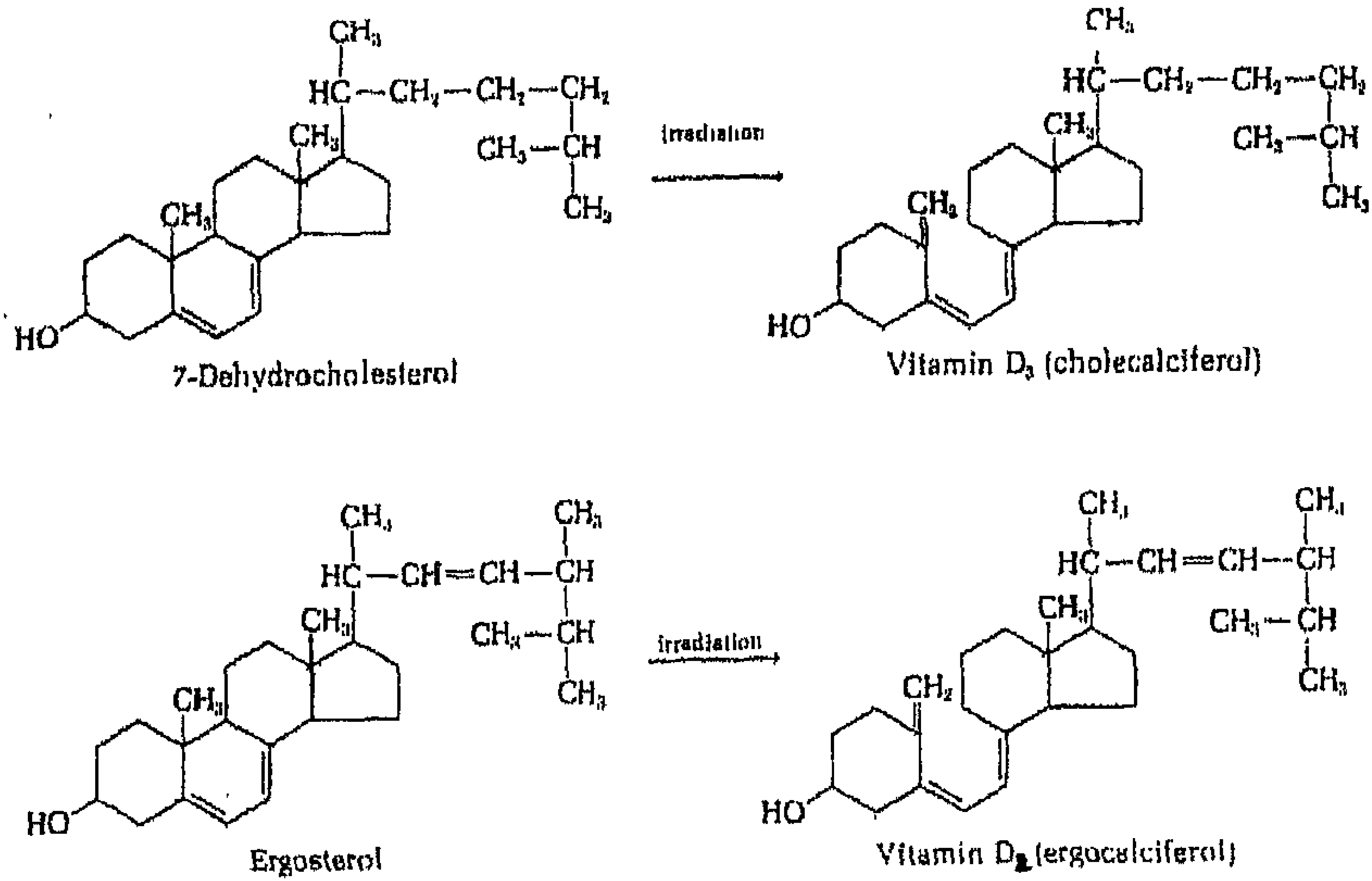
يلعب فيتامين D دوراً جوهرياً في السيطرة على أيض الكالسيوم والفسفور ووجوده ضروري لتكوين العظام والأسنان.

يعد الكبد وزيوت الأسماك مصادر غنية به ويؤدي نقص فيتامين D إلى الكساح.

من أهم فيتامينات D، فيتامين D_2 أي Ergocalciferol وفيتامين D_3 أي cholecalciferol.

يمكن إنتاج كلا الفيتامينين بتشعيع الستيرول المناسب بالأشعة فوق النفسجية المناسبة (230-313 نانوميتر). يتكون D_3 من تشعيع 7-Dehydrocholesterol

وفيتامين D_2 من الستيرول النباتي Ergosterol. ومن الجدير بالذكر وجود 7- Dehydrocholesterol طبيعياً في الطبقات البشروية Epidermal layers.



شكل 1-34 تكوين فيتامين D_2 وفيتامين D_1 من تشعيع 7-Dehydroecholesterol و Egosterol على التوالي

يؤدي استمرار التشعيع إلى تكوين مركبات إضافية لا يعرف تركيب البعض منها وتسمى Suprasterol وToxisterol.

1-5-2-1 الخواص الفيزيائية الكيميائية

فيتامينات D مواد عديمة اللون والرائحة، ثابتة تجاه الأوكسجين في محلول زيتي حتى في درجة 100°م (عكس فيتامين A) وهي غير حساسة للقاعدة ولكنها حساسة للضوء.

لا يذوب فيتامين D_2 في الماء، ويكون قليل الذوبان في الزيوت والدهون ولكنه يذوب بسهولة في المذيبات العضوية. يظهر المركب فعالية بصرية، وتعتمد القيمة على المذيب المستخدم. يتميز محلول فيتامين D_2 في المذيبات العضوية

بطيف إمتصاص ذي قمة بالقرب من 265 نانوميتر في الكحول. قابلية ذوبان D_3 ذوبان D_2 ويتشابه طيف إمتصاصه مع طيف امتصاص فيتامين D_2.

1-5-2-2 وجود فيتامينات D

لا يوجد فيتامين D بكميات كبيرة في الطبيعية ، يوجد أعلى تركيز لفيتامين D في زيوت الأسماك مقارنة بالأغذية الأخرى بشكل الحليب ومنتجاته والبيض وكبد الثور والخنزير أهم مصادره في غذاء الإنسان ويعتقد بأن فيتامين D_3 يوجد فقط في زيت كبد السمك .

تحتوي العديد من الأغذية على كميات لا يستهان بها من أسلاف فيتامين Provitamins – D وخصوصا الحليب ومنتجاته والبيض والفطر، تتراكم أسلاف فيتامين D بصورة رئيسية في الجلد ويكون جلد الخنزير مصدرا غنيا بها .

أن فيتامين D_3 (7.Dehydrocholesterol) من الكولسترول في الكائن الحي، يشكل الناتج الأيضي الاعتيادي ويتراكم بصورة رئيسية في الجلد، لا يمتلك جسم الإنسان النظام الأنزيمي القادر على تحفيز تحول سلف فيتامين D_3 إلى فيتامين D_2 .ويحصل هذا التحول فقط عند تعرض الجلد إلى ضوء الشمس أو الأشعة البنفسجية .وفي حليب الأبقار .يكون محتوى فيتامين D أعلى إذا كانت الأبقار خارجا عن المراعي .

1-5-2-3 أيض فيتامين D

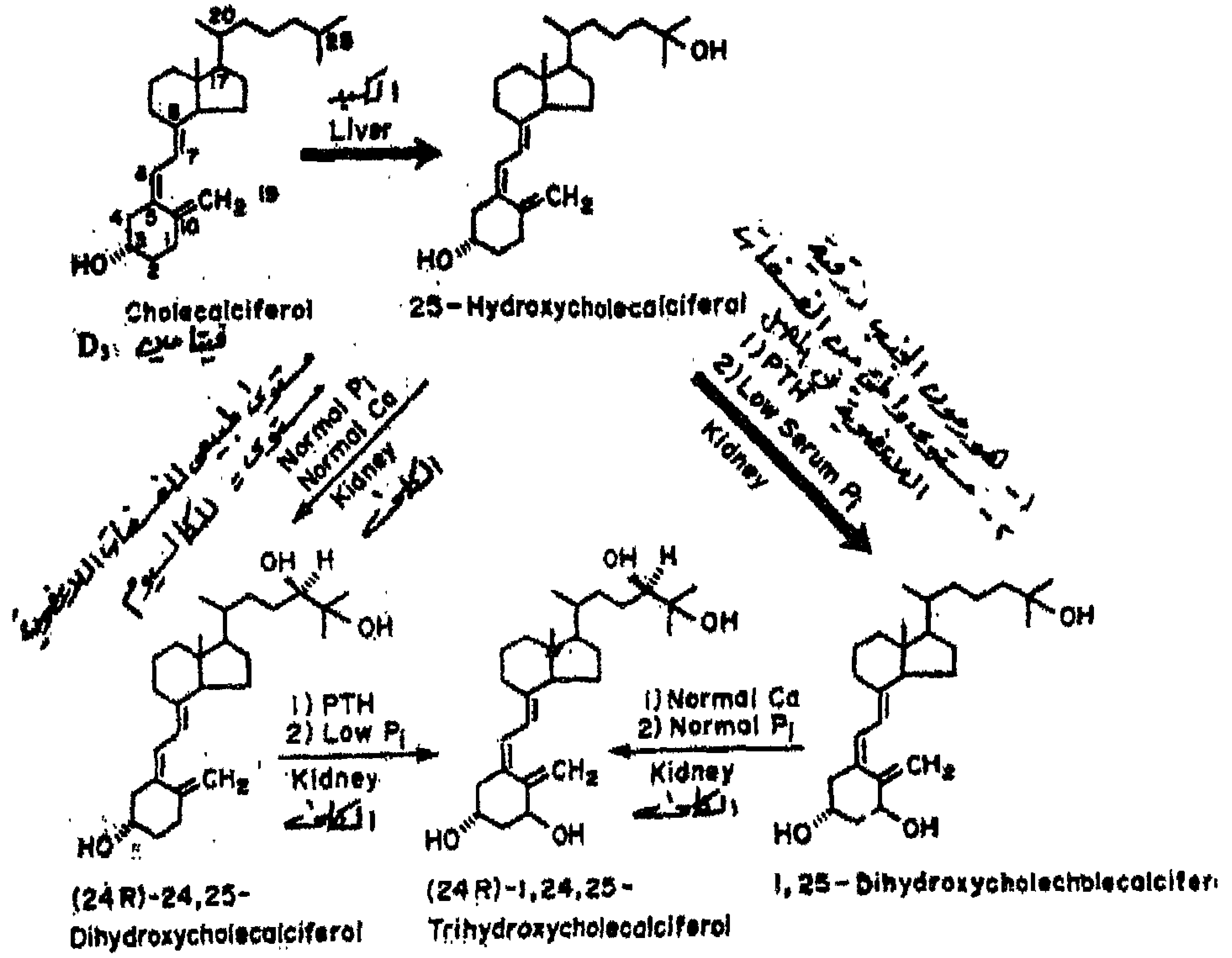
عرفت فيتامينات D منذ زمن بعيد بفعاليتها ضد كساح الأطفال .أن هذه الفعالية تعود للتحول الأيضي لفيتامين D إلى D.25-Dihybroxy Vitamin الذي يشكل واحدا من أهم المنظمات الفيزيولوجية لأيض الكالسيوم (Ca_2^+)

والفوسفات اللاعضوية (Pi) والعظام .تشجع هذه المادة الهورمونية تكوين العظام وتؤازر عمل هرمون الجنب درقية Parathyroid في الحفاظ على مستوى طبيعي للكالسيوم (Ca^{2+}) في مصل الدم .

يعد فيتامين D_3 سليفة هورمون Prohormone .

وتتكون الصيغة الفعالة لفيتامين D في الحي 1.25-Dihydroxychlecal-in vivo ciferol بتفاعل هدركسله متعاقبين لفيتامين D_3 أولا في الموقع 25 في الكبد بتأثير أنزيم bydroxylase ومن ثم في الموقع 1 في الكلى، .وتعزى فعاليات فيتامين D الرئيسة إلى تكوين هذه الصيغة الفعالة التي تمتلك فعالية هورمونية ويسمى 1.25-Dihydroxy Cholecalciferol هورمونا لأنه ينتج في نسيج ويظهر تأثيره في نسيج آخر حيث ينظم نقل أيونات الكالسيوم والفسفات عبر الأغشية الخلوية للأمعاء، كما أنه يشجع إعادة امتصاص الكالسيوم من العظام ومن الراشح الكلوي وبذلك يرفع مستوى الكالسيوم في الدم .ينظم تكوين هذا الهورمون بسلسلة من الحلقات الأيضية قابلة للتثبيط بالتقليم الراجع Feed back inhibition تخضع لتأثير تركيز أيونات الـ PI و Ca^{2+} (فسفات لاعضوية) وهرمون الجنب الدرقية، فمثلا إذا انخفض مستوى الكالسيوم في الدم إلى مادون 2.5 ملي مولار، يفرز هرمون الجنب درقية الذي يشجع بدوره تكوين 1.25– Dihydroxycholecaiciferol، ويظهر بأن هذه المواد توحد فعاليات فيتامين D في نظام هورموني قادر على السيطرة على Ca^{+2} و pi وأيض العظام.

يوضح الشكل (1–35) أهم تحولات فيتامين D_3



شكل (1-35)التفاعلات الايضية التي تشتمل على فيتامين D_3 ومواقع تنظيمها

المسلك المهم لتكوين الصيغة الفعالة 1.25 Dihydroxy vitamin D موضح بسهم عريض. PTH= هرمون الجنب درقية Parathyroid hormone. إن الهدركسلة في الموقع 24 تؤدي إلى تكوين الايبمر R Epimer R. يختلف فيتامين D_2 عن D_3 بوجود آصرة مزدوجة في السلسلة الجانبية ويتم هدركسلته بنفس الأنزيمات الموضحة لفيتامين D_3PTH= هرمون الجنب درقية.

1-5-2-4 الفعالية الحيوية لفيتامين D

إن الوظيفة الأساسية للصيغ الفعالة للفيتامين Dihydroxy Calciferols هي الحفاظ على أيونات pi Ca^{+2} في المصل بتراكيز وافية للنمو وترسبها المستمر في العظام Mineralization. ويتم ذلك بتأثيرها في الأمعاء والعظام

والكلى أيضاً.

ينبه 1.25 Dihydroxycholecalcferol امتصاص pi Ca+2 من الأمعاء وطرح الكالسيوم والفوسفات بواسطة الكلى وترسب الكالسيوم والفوسفات في العظام.

1-5-2-5 الحاجة اليومية لفيتامين D

من الصعوبة بمكان تحديد الحاجة المطلقة اليومية لفيتامين D وذلك لأنه يتكون بصورة طبيعية في جسم الإنسان بمساعدة ضوء الشمس ويقدر ما يحتاجه الرضع بـ 400–500 وحدة عالمية Iu يوميا. تعادل الوحدة العالمية 0.25 غم من فيتامين D_3 البلوري:

1-5-2-6 تعيين فيتامين D

يمكن تعيين فيتامين D بطرق مختلفة معيارية Standard يستخدم فيها تجارب الجرذان وكتاكيت الدجاج.

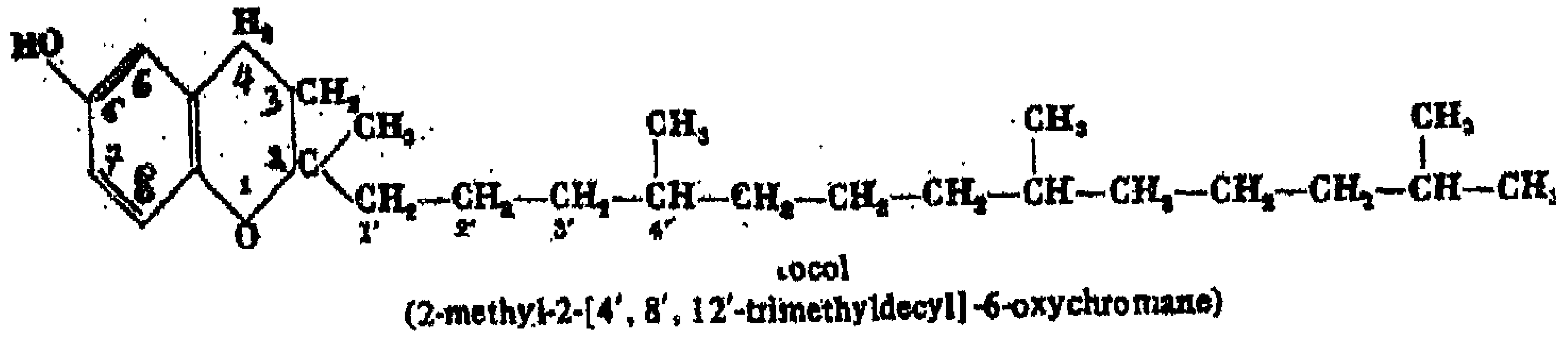
اعتمد خلال السنوات العشر الماضية، اختبار جديد لتعيين فيتامين D يستخدم فيه الفوسفات أوالكالسيوم الموسوم بالنظير المشع ويحدد المتراكم منه في عظام الحيوانات التجريبية.

إن كلتي الطريقتين دقيقة جدا ويمكن اجراؤهما بفترة زمنية أقصر مما تتطلبه الطرق الكلاسيكية.

الطرق الكيميائية لتعيين فيتامين D في الأغذية صعبة نسبيا لأن فيتامين D يوجد بتراكيز ضئيلة وتوجد معه مواد كيميائية أخرى تتفاعل بصورة مشابهة. لا توجد طريقة كيميائية عامة لتعيين الفيتامين وتستخدم معظم الطرق التفاعل بين فيتامين D وثلاثي كلوريد الانتموني بوجود كلوريد الاستيل الذي يعطي لونا اصفر لطريقة غير ناجحة لوجود كميات أكبر من فيتامين A ولهذا يجب التخلص منه بفصله عنه بكروماتوكرافي الطبقة الرقيقة.

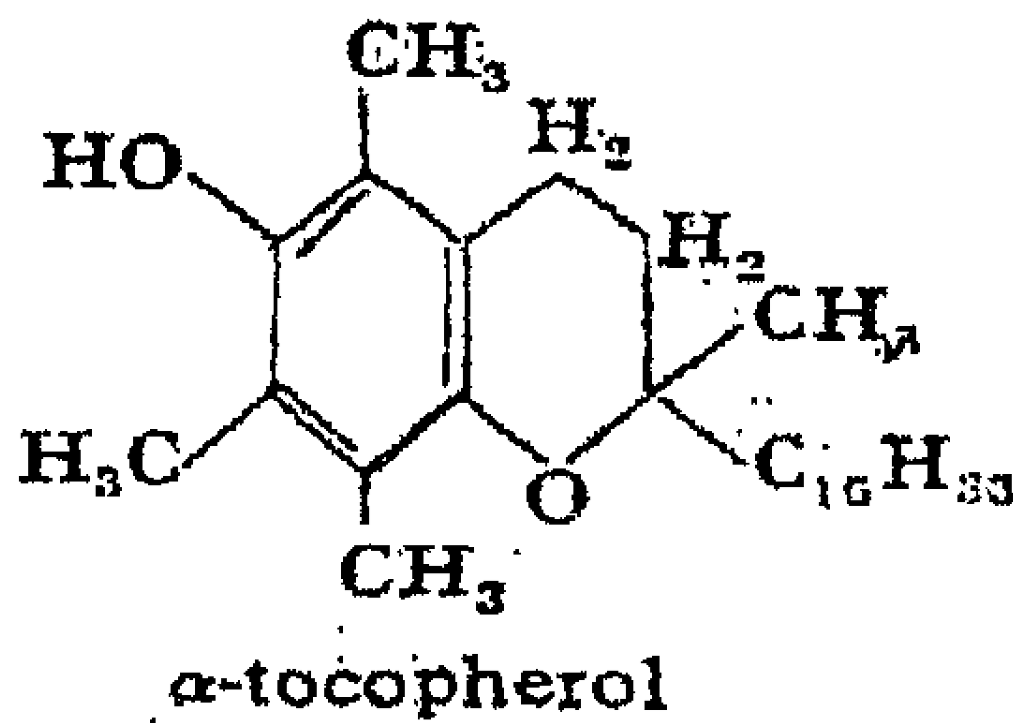
1-5-3 التوكوفيرولات (مجموعة فيتامين E)

يوجد في الطبيعة عدد من المركبات التي تظهر فعالية فيتامين E تسمى هــذه المركبــات Tocopherol– و x– Tocopherol وB- Tocopherol– وإلى آخره. تشتق جميع هـذه المركبات مـن المركـب Tocol وتختلف عن بعضها بالمجاميع المعوضة في حلقة البنزين:

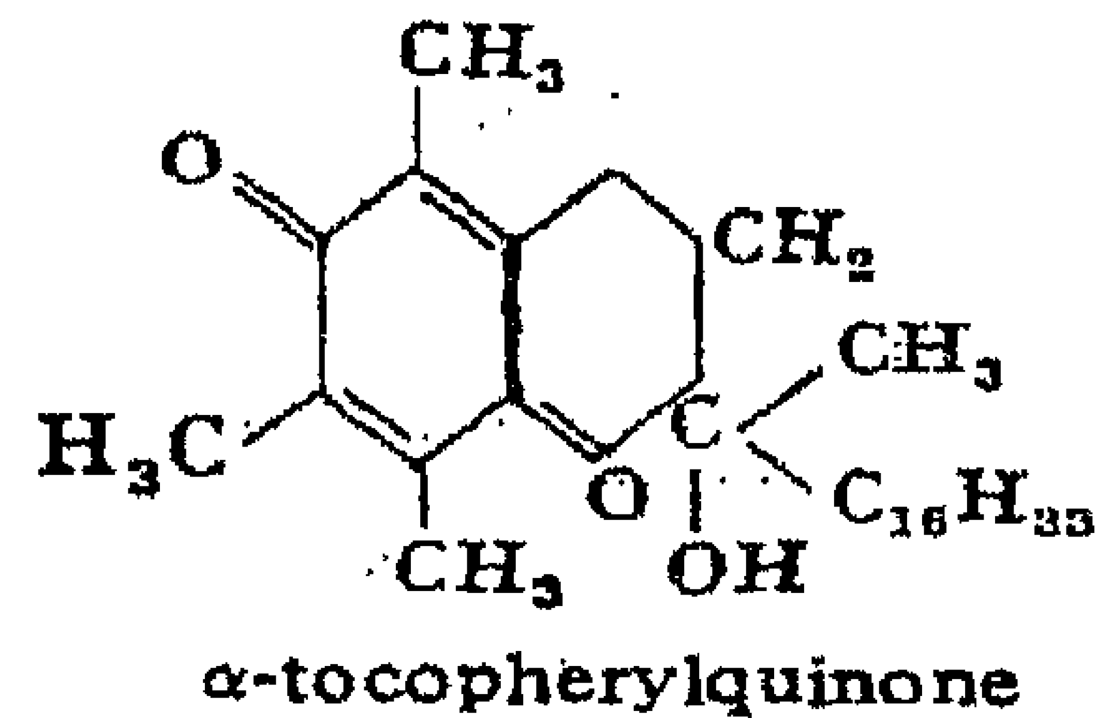


tocol
(2-methyl-2-[4', 8', 12'-trimethyldecyl] -6-oxychromane)

فمثلا a Tocopherol هـو 5.7.8–Trimethyltocol أمـا B Tocopherol فهو 5.8 ــ Dimethyltocol و Tocopherol = –7.8Dimethyltocol و8–Methyl tocol = δ Tocopherol وTocopherol ε = 5–Methyltocol.



α-tocopherol



α-tocopherylquinone

1-5-3-1 الخواص الفيزيائية الكيميائية

التوكوفيرات زيوت لزجة في درجة حرارة الغرفة وقد يتبلور البعض منها عند انخفاض درجة الحرارة، للتوكوفيرولات لون اصفر باهت وهي قابلة للذوبان

في مذيبات الشحوم ولكنها غير ذائبة في الماء. تتأكسد التوكوفيرولات ببطء بوجود الأوكسجين الجوي ولكنها ثابتة تجاه الحرارة في غيابه- إلى حوالي 200°م. يغمق لون التوكوفيرولات تدريجيا عند تعرضها للضوء وهي لا تتأثر بحامض الكبريتيك أو الهدروكلوريك إلى حوالي 100°م كما أنه ثابتة تجاه القواعد في غياب الأوكسجين. وان استرات التوكوفيرول التي تحضر باسترة مجموعة الهدروكسيل للفينول وكمثال Acyl tocophenols تكون ثابتة تجاه الأوكسجين الجوي وهي غالبا ما تكون بلورية.

تمتص التوكوفيرولات في المنطقة فوق البنفسجية عند حوالي 295 نانوميتر (جدول 1-8) Chromanol- Chromophore في محلول الايثانول وعند تكوين tocopherol Acyl ينحرف الإمتصاص إلى الأطوال الموجية الأقصر (276-285 نانوميتر) ويصاحب ذلك انخفاض في الإنطفائية {E_1% icm =(55-36)}

جدول (1-8) قمم الامتصاص للتوكوفيرولات في محلول الايثانول

E 1% icm	X max	المركب Tocopherol
75.8	292	-x
89.4	296	-B
91.4	298	-y
87.3	298	8-

1-5-3-2 وجود التوكوفيرولات في الأغذية

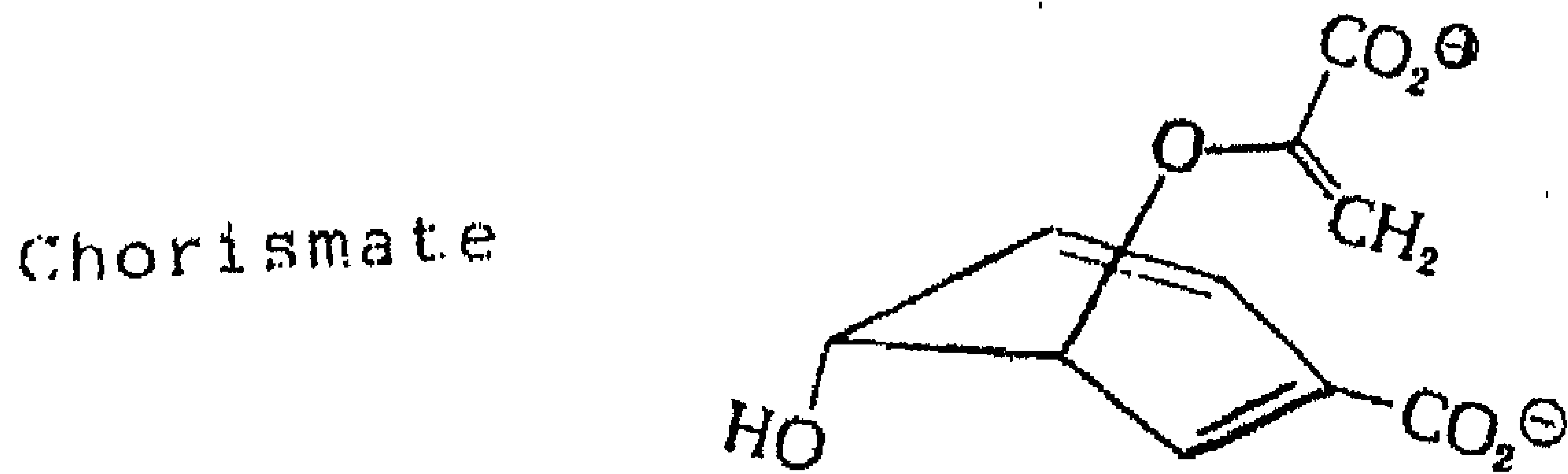
تنتشر التوكوفيرولات في الأغذية بصيغة غير مؤسترة وتوجد بأعلى تركيز في زيوت حبوب الفصيلة النجيلية Cereal كالحنطة والشعير والذرة والأرز. تدل الإحصائيات في الولايات المتحدة على أن أكثر من نصف الكمية المتناولة من

–الفا– توكوفيرول يومياً مصدرها الزيوت والدهون ذات المصدر النباتي: ويمتلك Tocopherol – $d-\alpha$ أعلى فعالية حيوية ضمن التوكوفرولات. وهو عادة أكثر انتشاراً. ان وجود التوكوفيرول في الخضراوات الورقية والحليب والزبد وصفار البيض والزيوت النباتية مهما لتغذية الانسان.

وفي الحيوانات يكون الكبد والقلب والكلى مصادر غنية به. كما تخزن كميات لا يستهان بها في شحوم الجسم، وتبعاً لمحتواها من التوكوفيرول تكتسب هذه الشحوم حماية ضد التلف الناتج عن الأكسدة الذاتية عند خزنها.

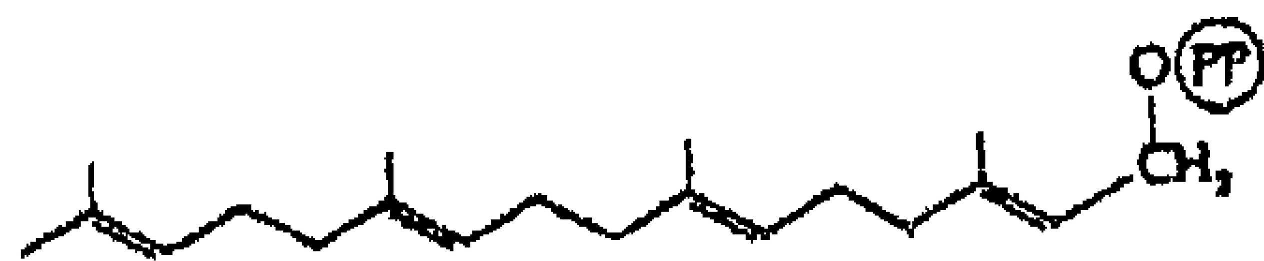
1-5-3-3 التخليق الكيميائي الحياتي

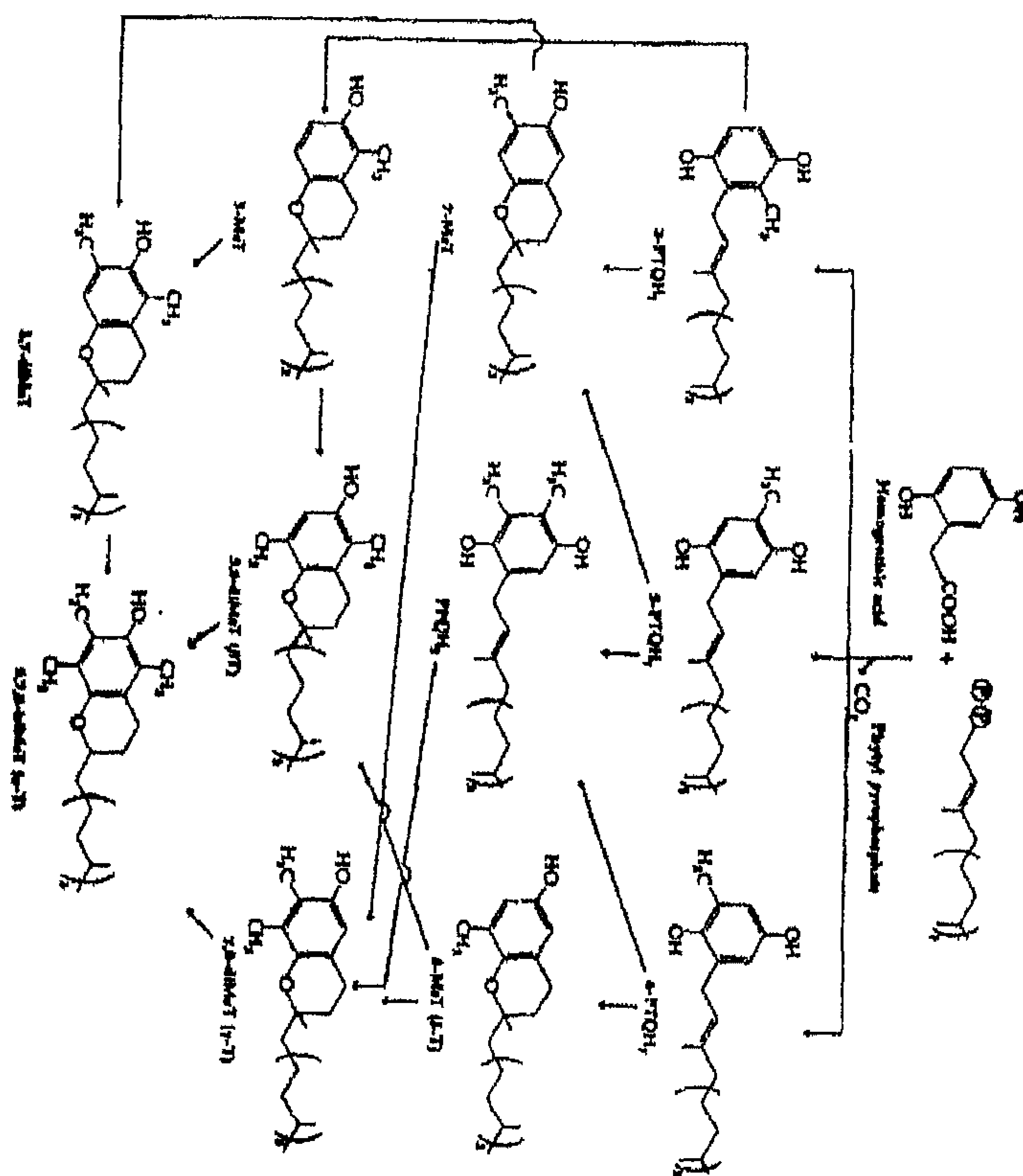
تستخدم النباتات المركب Chorismate(أحد المركبات الوسطية في تخليق التيروسين والفنيل النين) مصدرا لتخليق الهوموجنتسات Homogentisate وهي ناتج طبيعي في أيض التيروسين في الثديات.



تقترن الهوموجينتسات مع بيروفسفات الفايتيل phytyl pyrophosphate مع إزالة CO_2 وينتج عن العملية تكوين phytyloluquinols (شكل 1-36). تشتق مجموعتا المثيل الاخرتين من المركب S.Adenosylmethionine كما يمكن اقتران الهوموجنتسات مع Geranylgeranyl pyrophosphate لتكوين toluquinols حاوية على ثلاث أواصر مزدوجة أخرى في السلسلة الجانبية. وهذه المركبات تؤدي إلى تكوين zocotrienols التي تشابه التوكوفيرولات فيما عدا وجود الأواصر المزدوجة الثلاثة في السلسلة الجانبية وتكون هذه المركبات فعالة

مثل فيتامين E.





شكل (1-36) المسالك المحتملة لتكوين التوكوفيرولات

Phaseolus vulgaris, في الفاصوليا

Phytyltoluquinols = $PTQH_2$

Phytylplastoquinone= $PPQH_2$,

Methyltocol= MeT,

Dimethyltocol= diMeT,

Trimethyltocol= triMetT,

B- T, α-T ... إلخ = α - Tocopherol B. Tocopherol ... إلخ.

إن الكورزمات chorismate مركب وسطي مهم في تخليق الأحماض الأمينية الأروماتية وثمالة p-Aminobenzoate الحامض الفولك والتوكوفيرولات والكوينونات الأخرى لفيتامين k واليوبكوينون.

1-5-3-4 تحضير التوكوفيرولات صناعياً

يمكن تحضير التوكوفيرولات بالتركيب الكيميائي كما يمكن استخلاصها من المواد الطبيعية الخام وكمثال من زيت الذرة أو بذورالقطن أو فول الصويا. تحتوي هذه الزيوت على 0.02-0.2٪ فيتامين E التوكوفيرولات غير الالفا-توكوفيرول نسبة لا يستهان بها فمثلا يحتوي زيت بذورالقطن على حوالي 60٪ الفا-توكوفيرول و40٪ كاما- تكوفيرول، أما زيت فول الصويا فيحوي على حوالي 20٪ الفا- توكوفيرول و 60٪ كاما- توكوفيرول و20٪ دلتا- توكوفيرول.

تحتوي الزيوت النباتية المركزة على النسب التقريبية نفسها للتوكوفيرولات الموجودة في الزيوت الأصلية. إن تحضير زيوت مركزة حاوية على نسبة عالية من الفا- توكوفيرول، ذات أهمية خاصة ذلك لأن الالفا- توكوفيرول يمتلك أعلى فعالية فيزيولوجية.

تختلف طرق التصنيع التجاري تبعا لفعالية نوعية المنتوج المرغوب فيه. يمكن تحضير الزيوت المركزة ذات الفعالية الواطئة، بعملية الصوبنة Saponification ويتبع ذلك استخلاص المواد غير القابلة للتصبين. وكبديل لذلك يمكن الاستخلاص بالكحول الساخن ثم إزالة الشحوم بالتجميد في درجات حرارة منخفضة ثم تبخير المذيب للحصول على الزيت المركز.

لقد استخدم التقطير التجزيئي للزيوت النباتية بوصفه طريقة كفؤة وعملية لتحضير التوكوفيرولات المركزة وعند استخدام التقطير التجزيئي مع

الصوبنة أو الاستخلاص، يمكن تحضير مركزات التوكوفيرولات ذات فعالية عالية.

إن الطرق المذكورة أعلاه مناسبة لتركيز التوكوفيرولات من مصادرها الطبيعية وهي لا تغير نسبة الفا- توكوفيرول/ التوكوفيورلات الأخرى، ولتحضير مركزات عالية بنسبة محتواها من الفا- توكوفيرول تستخدم طرق أخرى وكمثال يمكن استخدام كروماتوكرافي الامتزاز لتحضير التوكوفيرولات المختلفة بصورة نقية تقريبا كما أنه يمكن تحويل أحادي وثنائي مثيل التوكوفيرول إلى ثلاثي مثيل التوكوفيرول (الفا- توكوفيرول).

غالبا ما تعرض مركزات التوكوفيرول إلى معاملات كيميائية أخرى لتحويلها إلى صيغ أخرى مرغوب فيها اقتصاديا وكمثال تكون استرات الاستات ثابتة جدا تجاه الأكسدة الهوائية تحت معظم الظروف.

1-5-3-5 تعيين التوكوفيرولات في الأغذية

يتم تعيين فيتامين E بايولوجيا باختبار العقم وإعادة امتصاص الجنين Resorption Sterility test والذي يعتمد على حقيقة عدم مقدرة الفأر- الذي يعاني من نقص فيتامين E على حمل الجنين للفترة المحددة للحمل وإنما يعيد امتصاصه (أي الجنين) بعد فترة قصيرة.

يعطي اختبار الانحلال الدموي Hemolysis قياسا دقيقا لفعالية فيتامين E وأساس هذا الاختبار الميل الكبير للإنحلال الدموي لكريات الدم الحمراء للحيوانات المصابة بنقص فيتامين E لا توجد تفاعلات نوعية للتعيين الكيميائي للتوكوفيرولات ويتم عادة فصل التوكوفيرولات بعناية وتحريرها من المواد المتداخلة ثم تعزل التوكوفيرولات المختلفة بالكروماتوكرافي. يتم تعيين التوكوفيرولات بطرق Emmerie وEngel حيث يختزل الحديد ثلاثي التكافؤ Fe III إلى حديد ثنائي التكافؤ Fe II بوجود التوكوفيرولات. ثم يتم تفاعل Fe

II مع dipyridyl -α_1 لإعطاء معقد احمر غامق يمكن قياس انطفائيته Extinction بالمطياف وتقارن بمنحني عياري Standard curve.

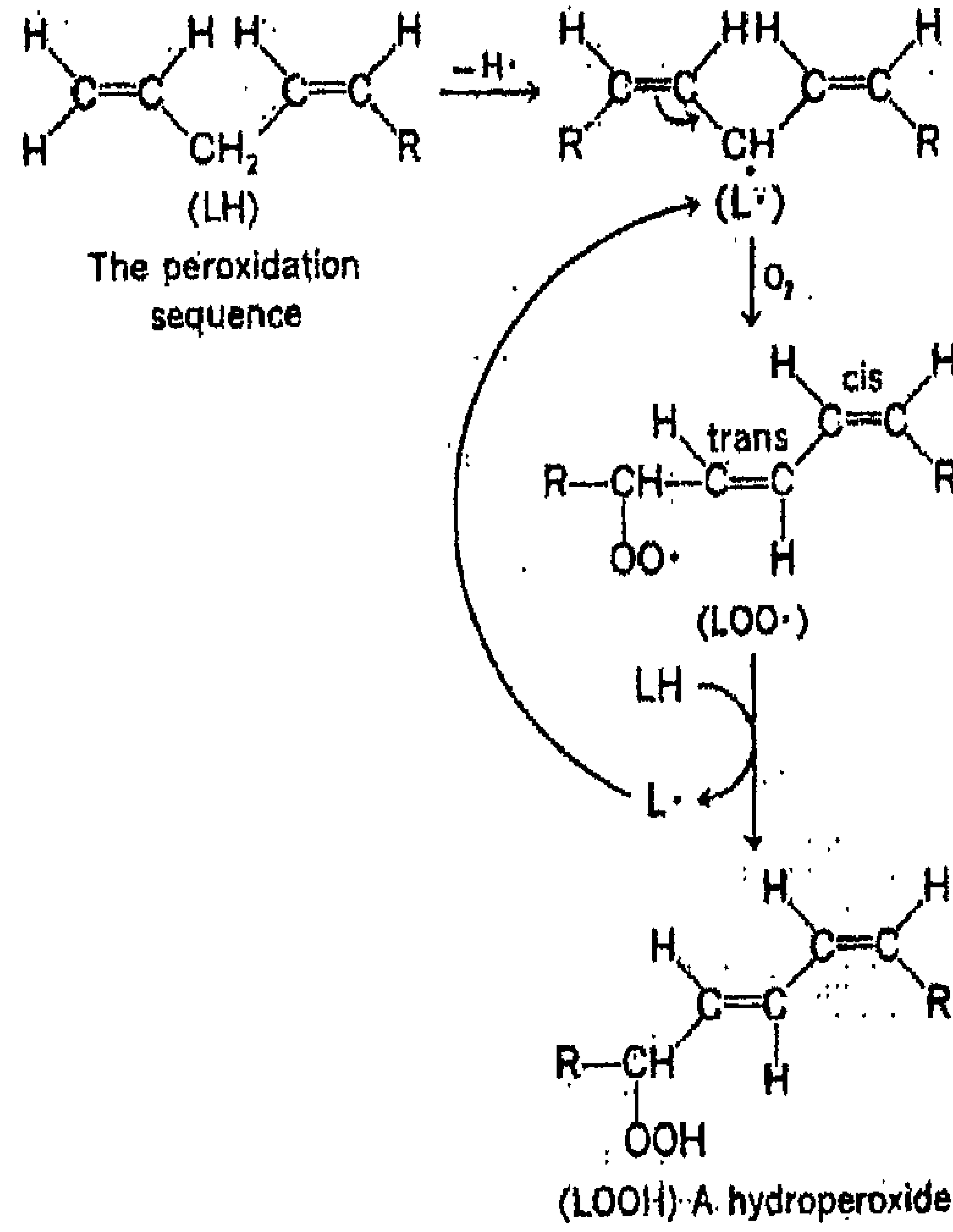
ومن الطرق الفيزياثية المستخدمة لتعيين التوكوفيرولات قياس التألق Fluorometric methods أو بالقياسات البولاروكرافية.

1-5-3-6 تأثيرات التوكوفيرولات المضادة للأكسدة

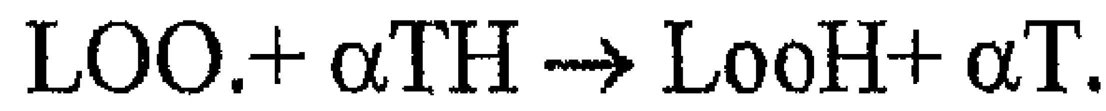
التوكوفيرولات فعالة في الزجاج In Vitro بوصفها مضادات لأكسدة الدهون والزيوت وتحضيرات فيتامين A، ولقد استخدمت على نطاق واسع لضمان ثبوتيتها ضد الأكسدة (تضاف بنسبة 0.01-0.1٪).

تؤدي الكميات القليلة من حامض السترك والأحماض الأمينية إلى مؤازرة عمل التوكوفيرولات وتعود الفعالية العالية للتوكوفيرولات الخام كمضادات للأكسدة إلى وجود الموازرات الطبيعية Natural synergists. لقد اقترح بأن الفعالية الحيوية للتوكووفيرول تكمن في قدرته على حماية انظمة المايتوكوندريا في التثبيط غير العكوس بيروكسيدات الشحوم .

ان المايتوكوندريا المحضرة من حيوانات ذات نقص فيتامين E ، تظهر اضمحلالاً في الفعالية بسبب البرأكسدة Peroxidation للحموض الدهنية غير المشبعة والتي توجد عادة في هذه العضيات:

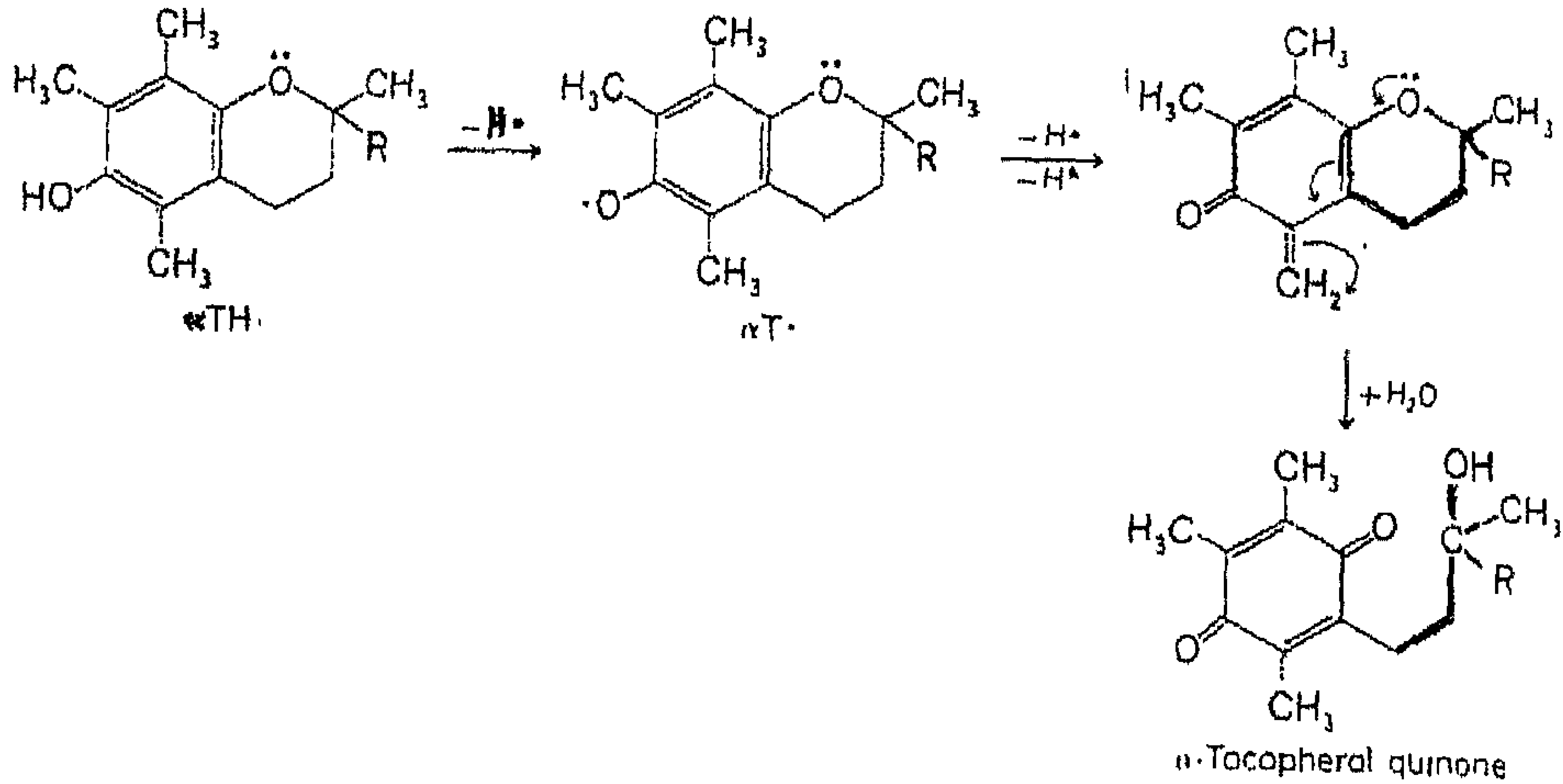


يكسر الفا- توكوفيرول سلسلة التفاعلات بإسهامة في التفاعلات الآتية :


LOO.+ αTH → LooH+ αT.

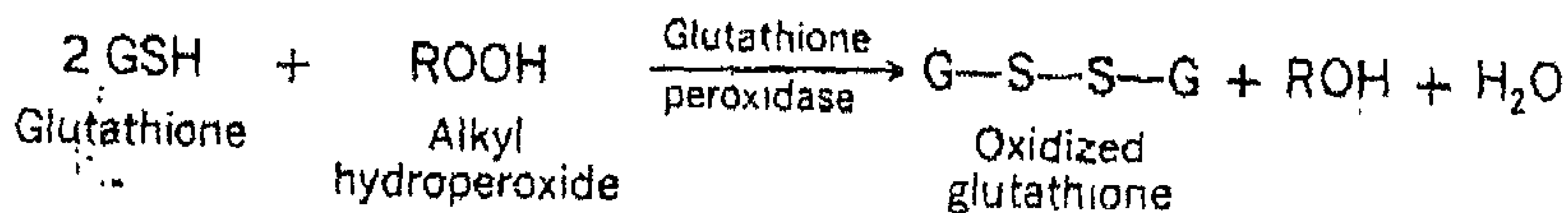

L. + αTH → LH + αT.

يمكن أن يتحول الفا-توكوفيرول كيميائياً إلى الفا- توكوفيرول كوينون:



وهكذا يؤدي الفا-توكوفيرول إلى كسر تفاعلات الجذور وبهذا يثبط البرأكسدة peroxidation المتلفة للأحماض الدهنية الحاوية على أكثر من آصرة مزدوجة والتي تقترن دائماً بشحوم المايتوكوندريا.

لاحظ علماء التغذية عدة سنوات تشابها شديداً بين التأثيرات الغذائية للالفا- توكوفيرول والكميات القليلة للسلنيوم Selenium (0.05 أجزاء في المليون في اليوم الواحد). ومن المعروف الآن بأن السلنيوم أحد المكونات الجوهرية للأنزيم Glutathione peroxidase الذي يكسح مركبات الهدروبيروكسي السامة في الأنسجة بالتفاعل الآتي:-



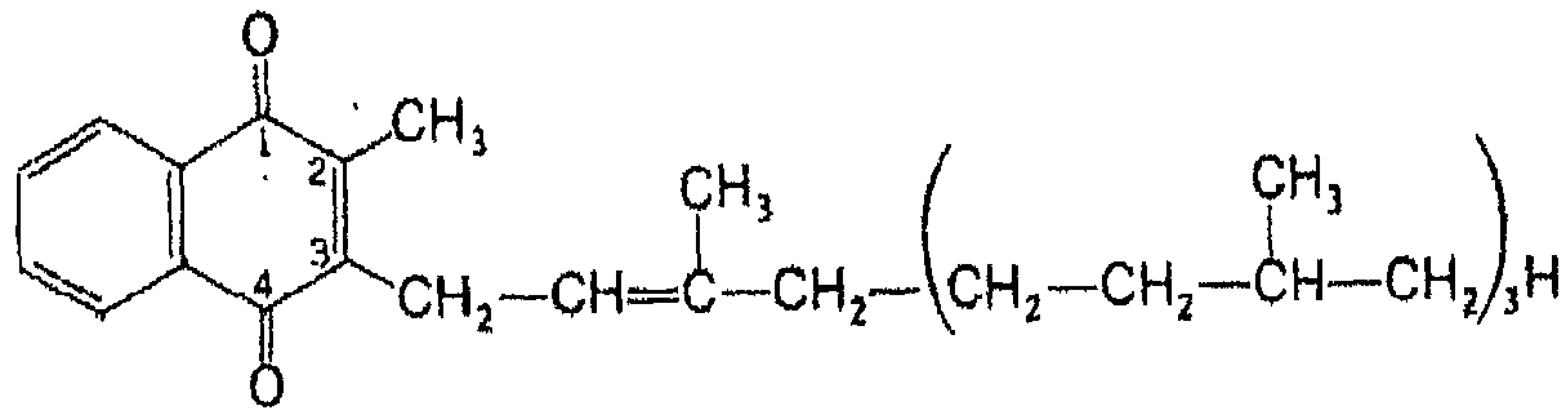
وهكذا يمتلك الإنسان خطين للدفاع ضد مركبات الهدروبيروكسيد السامة:

(أ) الفا-توكوفيرول الذي يمنع جزئياً تكوين هذه المركبات.

(ب) peroxidase Glutathione الـذي يحـول الهدروبيروكـسيدات الـسامة (المتناولة أو المتكونة داخل الجسم) إلى كحولات ثانوية وأولية غير مؤذية.

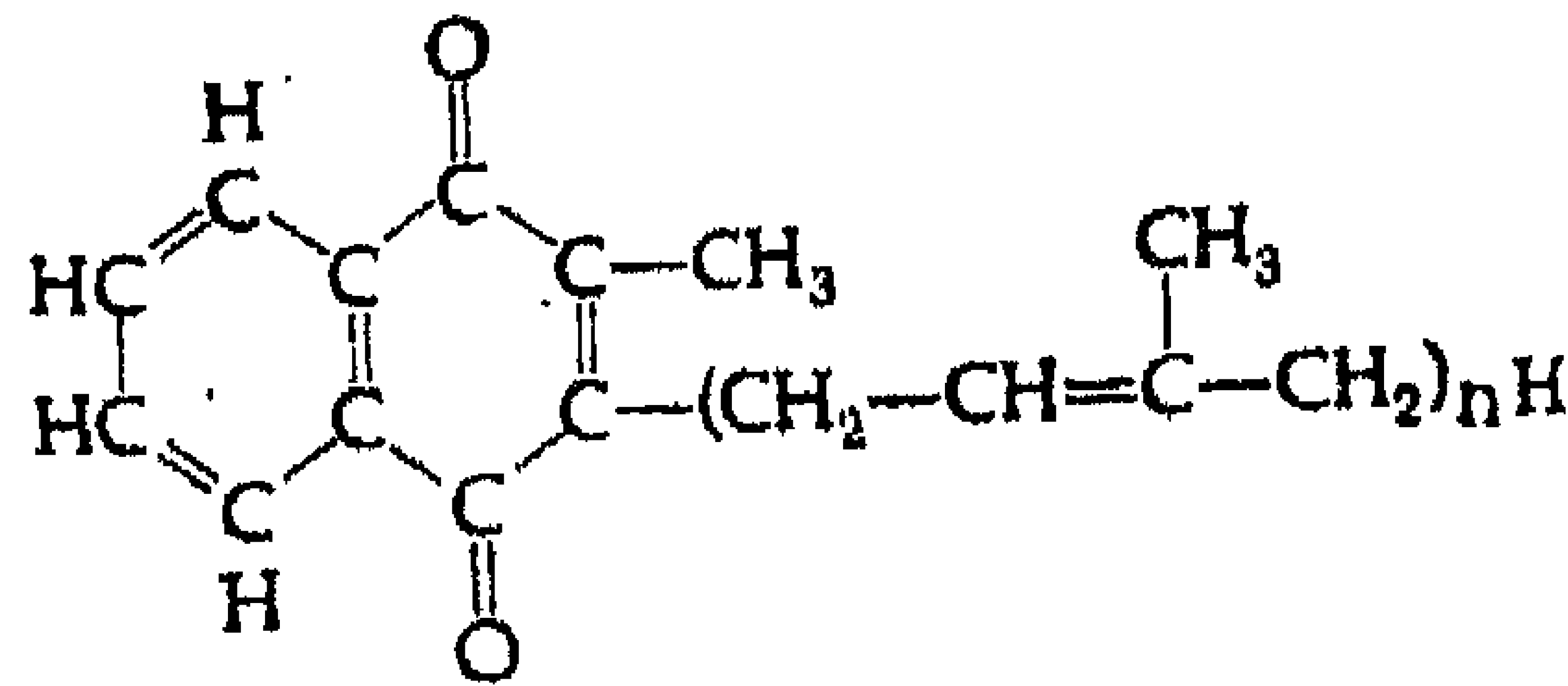
1-5-4 مجموعة فيتامين k

تعد فيتامينات k مشتقات للنفثوكوينون Naphthoquinone ولقد تم عزل فيتامين k لأول مرة من الجت Alfalfa وتتكون سلسلة الفايتيل phytyl الجانبية من أربع وحدات ايزوبرين ثلاث منها مهدرجة.



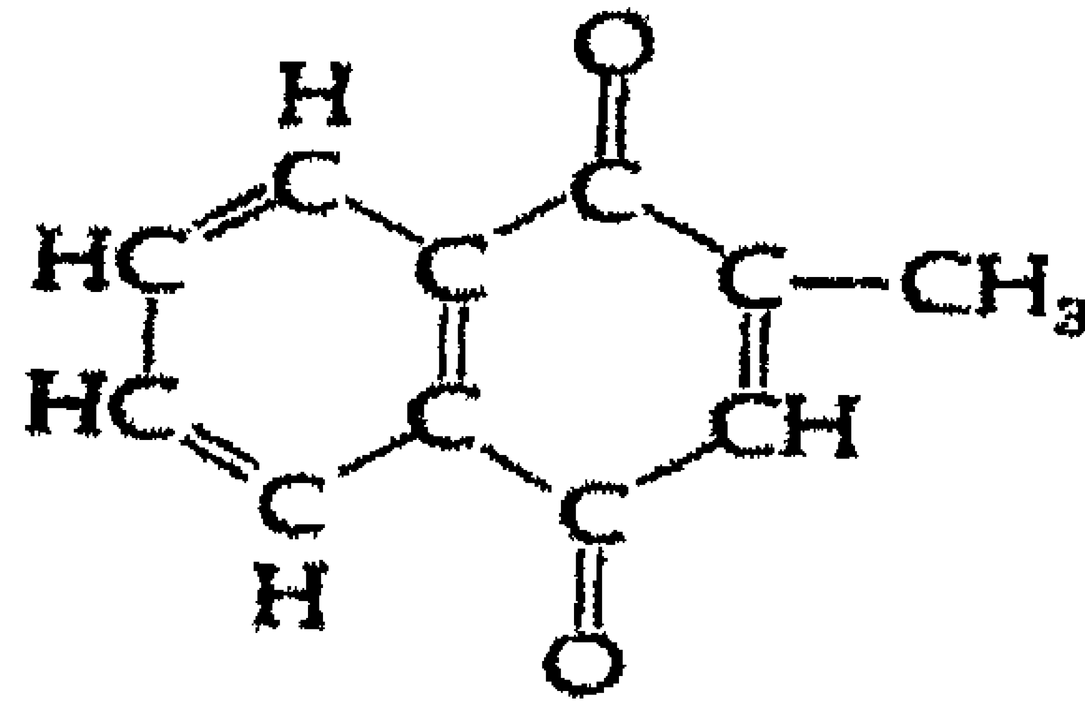
vitamin K_1

تحتوي سلسلة فيتامينات k_2 من 6 إلى 9 وحدات ايزوبرين في السلسلة الجانبية ولقد امكن عزل فيتامينات k_2 من البكتيريا والأسماك.



Vitamin K_2 series n = 6-9

يمتلك المركب ميناديون ويسمى أيضاً مينا كوينون أو 2- مثيل- 1، 4- نفثا كوينون Menadione، Menaquinone، 1.4–naphthoquinonxe 2—methyl الحلقة الكوينونية نفسها ويظهر الفعالية نفسها لفيتامين k_1 على أساس التركيز المولاري وربما يعود السبب لسهولة تحوله إلى فيتامين k_1.



Menadione (2-methyl-1,4,-naphthoquinone)

1-5-4-1 وجود مجموعة فيتامين k

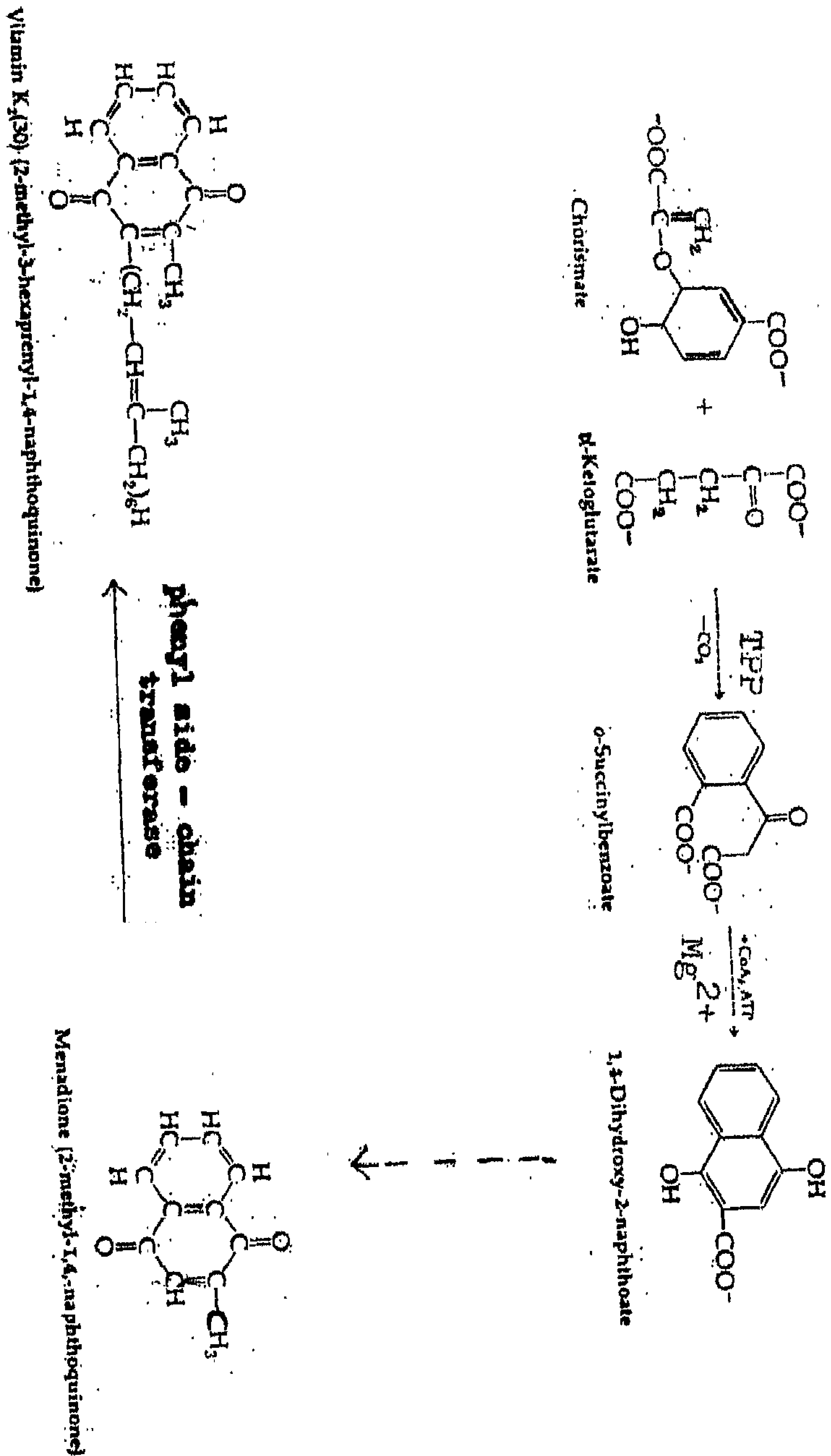
عزل فيتامين k_1 أول مرة من مصدر نباتي وتبقى المصادر النباتية مصدراً جيداً لفيتامين k_1. فيتامينات k_2 تكونها البكتريا وخصوصا الموجودة في الأمعاء، ولهذا من الصعوبة ايضاح نقص في فيتامين k في الأصحاء إلا أنه قد يحصل نقص فيه في الحالات التي تتلف فيها هذه البكتريا أو يثبط نموها وكمثال عند تناول المضادات الحيوية لفترة طويلة بصورة خاصة.

1-5-4-2 التخليق الحيوي

يتكون فيتامين k من الكورزمات Carismate التي تمثل الجزيئة السلف لعدة مركبات اروماتية (شكل 1-37). تتفاعل الكورزمات مع -Ketoglutarate x بوجود (TPP) Thiamine pyrophosphate لتكوين O-Succinylbenzoate. يتحول Succinylbenzoate-O إلى dihyroxynaphthoate خلال مشتق التميم الأنزيمي Coenzyme A)A). إن إزالة كربوكسيل المركب Naphthoate ثم مثيلته Methylation يعطي الشكل المختزل menadione وتضاف سلسلة البرينيل prenyl بعد ذلك.

عند إطعام Menadione (C14) لحيوان تجريبي. يظهر فيتامين K في الكبد حاويا على 4 وحدات ايرزوبرين (20) K وكذلك الحال عند زرق الصيغ الأخرى لفيتامين K. وهذا يدل على أن السلاسل الجانبية الأخرى تزال وتثبت

سلسلة حاوية على 20 ذرة كربون في الحلقة. إن الأنزيم المسؤول عن هذا التفاعل هو ذات الأنزيم المسؤول عن إضافة السلسلة الجانبية لليوبكوينون.



يكون فيتامين K مسؤولاً عن التخثر الطبيعي للدم ولهذا يسمى الفيتامين ضد النزف Antithaemorrhagic ويعمل ناقلا للهدروجين في بعض الكائنات في السلسلة التنفسية.

1-5-4-3 تعيين فيتامين K

تستخدم الطرق البايولوجية عادة لتعيينه ولا تستعمل الطرق الكيميائية عادة لأنها تفتقر إلى الخصوصية لوجود الكوينونات المختلفة

1-6 ملاحظات ختامية في تغذية الإنسان

من غير المحتمل اكتشاف متطلبات غذائية جديدة بالطرق الكلاسيكية التي تم بها اكتشاف عوامل الغذاء الجوهرية، ويبقى الاحتمال موجوداً بحاجة الإنسان والحيوانات إلى مركبات إضافية غير معروفة قد تجهزها البكتريا المعوية أو قد تنتقل من الدم إلى الجنين بكميات كافية للحفاظ على النمو وسلامة الصحة من جيل إلى آخر.

إن مراجعة المعلومات المتوافرة حالياً عن الأدوار الأيضية للعوامل الغذائية المختلفة والأمراض الناجمة عن نقصها تكشف عن جهلنا الكثير عن آلية تأثيرها في التفاعلات الأيضية ذات العلاقة. فمثلا لا يمكن تفسير ظواهر الإسهال والتهاب الجلد والخرف المميزة لمرض البلاكرا بوظائف نيوكليوتيدات البريدين.

وإن التهاب الأعصاب الناجم عن مرض البري بري لا يمكن تفسيره على أساس اضمحلال فعالية الأنزيم pyruvate dehydrogenase. وبالحقيقة فإن إسهام فيتامين A في عملية النظرودور فيتامين K في تكوين أسلاف الفيتامينات Zymogens لأنزيمات تخثر الدم، تمثل أفضل الأمثلة لوظائف الفيتامينات المعروفة تماماً.

1-7 التغذية المثالية

سعى الباحثون زمناً طويلاً إلى تعريف التغذية المثالية أو التغذية الجيدة الموازنة للإنسان. إن هذه العنوانات تبدو حالياً بدون معنى لأن الصحة الجيدة متناغمة مع مدى واسع من المواد الغذائية الأساسية المستهلكة وهي الكربوهيدرات والشحوم والبروتينات وأن كميات وموازنة المواد تؤثر في احتياجات الفيتامنيات. إضافة إلى ذلك هناك اختلافات كبيرة في الاحتياجات الغذائية الفردية في المدى المسمى بالظروف الطبيعية. يختلف الأفراد بصورة واسعة في احتياجاتهم للسعرات الحرارية اعتماداً على العمر والجنس والمهنة كما يختلفون في قدرتهم على الإنتفاع من المواد الغذائية المتناولة لإنتاج الطاقة نظراً لاختلاف قدرتهم على هضم وامتصاص ونقل أيض المواد المختلفة في الأغذية المتناولة بالسرع القصوى.

يمكن التأكيد هنا بأنه في الوقت الذي لا يمكن تعريف التغذية المثالية. يمكن تحديد الاحتياجات الدنيا الضرورية للصحة الجيدة.

إن الكميات اليومية التي يوصى بها (جدول 1-1.9-10) يمكن اعتمادها للغالبية العظمى من البشر الذين يستهلكون أصنافاً متنوعة معقولة من المواد الغذائية.

جدول 1- 9 كميات الفيتامينات التي يوصى بتناولها يومياً (المصدر 12)

					البروتينات		الفيتامينات الذائبة في الدهون			الفيتامينات الذائبة في الماء						
انج	سم	باون	كغم	العمر سنوات		غم	فيتامين E ملغم TE	فيتامين D Ng	فيتامين A Ng	فيتامين C (ملغم)	Bı2 Ng	Folcacin	B6 (ملغم) NE	نياسين (ملغم)	ريبوفلافين (ملغم)	ثيامين (ملغم)
24	60	13	6	0.5–5.0	الرضع	كغم × 2.2	3	10	420	35	0.5	30	0.3	6	0.4	0.3
28	71	20	9	1.0–0.5		كغم ×2.0	4	10	400	35	1.5	45	0.6	8	0.4	0.5
35	90	29	13	3–1	الأطفال	23	5	10	400	45	2.0	100	0.9	9	0.8	0.7
44	112	44	20	6–4		30	6	10	500	45	3.0	200	1.3	11	1.0	0.9
52	132	62	28	10–7		34	7	10	700	45	3.0	300	16	16	1.4	1.2
62	157	9	45	14–11		45	8	10	1000	50	3.0	400	1.8	18	1.6	1.4
69	176	145	66	18–15		56	10	10	1000	60	3.0	400	2.0	18	1.7	1.4
70	177	154	70	22–19		56	10	7.5	1000	60	3.0	400	2.2	19	1.7	1.5
70	178	154	70	50–23		56	10	5	1000	60	3.0	400	2.2	18	1.6	1.4
70	178	154	70	+51		56	10	5	1000	60	3.0	400	2.2	16	1.4	1.4
62	157	101	46	14–11	الإناث	46	8	10	800	50	3.0	400	1.8	15	1.2	1.1
64	163	120	55	18–15		46	8	10	800	60	3.0	400	2.0	14	1.3	1.1
64	163	120	55	22–19		44	8	7.5	800	60	3.0	400	2.0	14	1.3	1.1
64	163	120	55	50–23		44	8	5	800	60	3.0	400	2.0	13	1.2	1.0
64	163	120	55	+50		44	8	5	800	60	3.0	400	2.0	13	1.2	1.0
					الحوامل	30+	2+	5+	200+	20+	1.0+	400+	0.6+	2+	0.3+	0.4+
					المرضعات	20+	3+	5+	400+	40+	1.0+	100+	0.5+	5+	0.5+	0.5+

أ. NE – مكافئ النياسين ويساوي 1ملغم نياسين أو 60 ملغم تريتوفان غذائي.

ب. المقصود بالفولاسين Folacin المصادر الغذائية المعينة باستخدام البكتيريا بعد المعاملة بالأنزيمات لجعل صيغ polyglutamyl للفيتامين في متناول البكتيريا المستخدمة في طريقة التعيين.

جـ– RE= مكافئ الرتنول، كل مكافئ رتنول يعادل 1 (mg) في الرتنول أو (mg) من B - Carotene.

د– بمثابة 10 Mg كوليكالسفيرول = 400 وحدة عالمية من فيتامين D.

هـ– α – ET مكافئات ألفا – توكوفيرا 1 ملغم d – α – Tocopherol = من مكافئات ألفا – توكوفيرول.

جدول 1-10 الكميات المقترح تناولها لبعض الفيتامينات يومياً (المصدر 12)

	العمر (سنوات)	حامض البنتوتنك (ملغم)	الفيتامينات	
			بيوتين (mg)	فيتأمين K (Mg)
الرضع	0.5-0.0	2	35	12
	1.0-0.5	3	50	20-10
الأطفال	3-1	3	65	30-15
	6-4	4-3	85	40-20
	10-7	5-4	120	60-30
المراهقون	+11	4-7	100-200	50-100
البالغون		4-7	100-200	70-140

9-1 المصادر المعتمدة

1. Heimann W. & theimann A. Mechanisms der Wirkung and der Enzymatischen Zerstorugn der Acorbinsaure, Wissenschaftliche Veroffentlichungin der Deutschen Gesellschaft fur Ernahrung, Ascorbinsaure Band 14, 1964.
2. The association of vitamin chemists, Incarporation Methods of Vitaimin Assay, 3rd edn. Interscience Publishers New york and London, 1967.
3. Sebrell Jr W.H. & Robert S.H The Vitamins. Chemistry physiology, pathology, Methods. Vel I, 2nd edn. Academic press New york and London, 1967.
4. Sebrell Jr. W.H & Harris, R.S. The Vitamins:
5. chemistry, physiology, pathology, Methods. Vol V, 2nd edn, Acdemistry press, New York and London, 1972.
6. Whitaker J. R. Principles of Enzymology for the Food Sciences.
7. Marcel dekker Inc. New York and Basel, 1972.
8. Finar I.L Organic chemistry, Vol, 2, 5th end, Longman group Ltd, London, 1975.
9. Conn E.E and Stumpf P.K Outlines of Biochemistry 4th edn. John Wiley and Sons, Singapre, 1976.

10.Bruchmann B., Angewandte Biochemie Velag Eugen Eugen Ulmer, 1975.

11.Heimann W. Translater Morton C.Translation editors Morton, I & Scot, R. Fundementals of Food Chemistry, Ellis Horwood Ltd Avipublishing Company, West port, USA, 1980.

12.Rawn J.D. Biochemistry, Harper and Row publishers, New York, 1983.

13.Smith E.L. Hill, R.L. Lehman. I.R. Lefkowitz R.J. Handler,p and white, A. principles of Biochemistry:General Aspects. 7th edn. Mc Graw, Hill Bool Company, Hamburg, Longdon, Mexico, Tokyo, 1983.

14.Smith E.L. Hill, R.L. Lehman I.R. Lefkowitz R.j. Handler. P.& white A. Principles of Biochemistry:

15.Mammalian Biochemistry. 7th den. Mc Graw Hill Book Company, Hamburg, London, Mexico, Tokyo, 1983.

16.13-Belitz H.D. & Grosh W. Lehrbuch du Lebensmittel- Chemie springer-Verlag, 1985.

17.Mitchell, H.S. Rybergen, H.j. Anderson, L & Dibble, M.V. 15 th edn Coopers nutrition in Health and Disease. Lippincott Company, Philadelphia, 1068.

الفصل الثاني

الأنزيمات

الفصل الثاني

الأنزيمات

2-1 علم الأنزيمات:

لعلم الأنزيمات أهمية خاصة في العلوم الفيزيائية والحيوية. والأنزيمات واسعة الانتشار في المواد الحيوية وتشكل التفاعلات التي تحفزها الوجود الحي بأكمله. إن أي تغيير في النمط الطبيعي لأنزيمات كائن حي قد يؤدي إلى نتائج بالغة التأثير فيه .

الأنزيمات محفزات ذات أهمية خاصة للكيميائي الفيزيائي كما إن دراسة آلية التفاعلات الأنزيمية جزء مهم من علم الأنزيمات، ولقد نما هذا العلم خلال السنوات الأخيرة لأهميته في العديد من العلوم وخصوصا الكيمياء الحياتية والكيمياء الفيزيائية وعلم الأحياء المجهرية والوراثة والنبات والحيوان وعلم الأغذية وعلم الأدوية والسموم والباثولوجي والفيزيولوجي والطب والهندسة الكيميائية. ولتطبيقات علم الأنزيمات أهمية كبيرة في الصناعات الغذائية وفي مكافحة الحشرات والحرب الكيميائية والتنظيف الجاف وفي تشخيص الأمراض، كما وتستخدم بمثابة كواشف في بعض التحاليل المختبرية، وكمثال تقدير الكلوكوز باستخدام الأنزيم المؤكسد للكلوكوز إضافة إلى استخدامها للعلاج في بعض الأحيان وكمثال استخدامها لاذابة خثرة الدم في المرضى المصابين بالخثار Thrombosis .

2-2 لمحة تاريخية في علم الأنزيمات

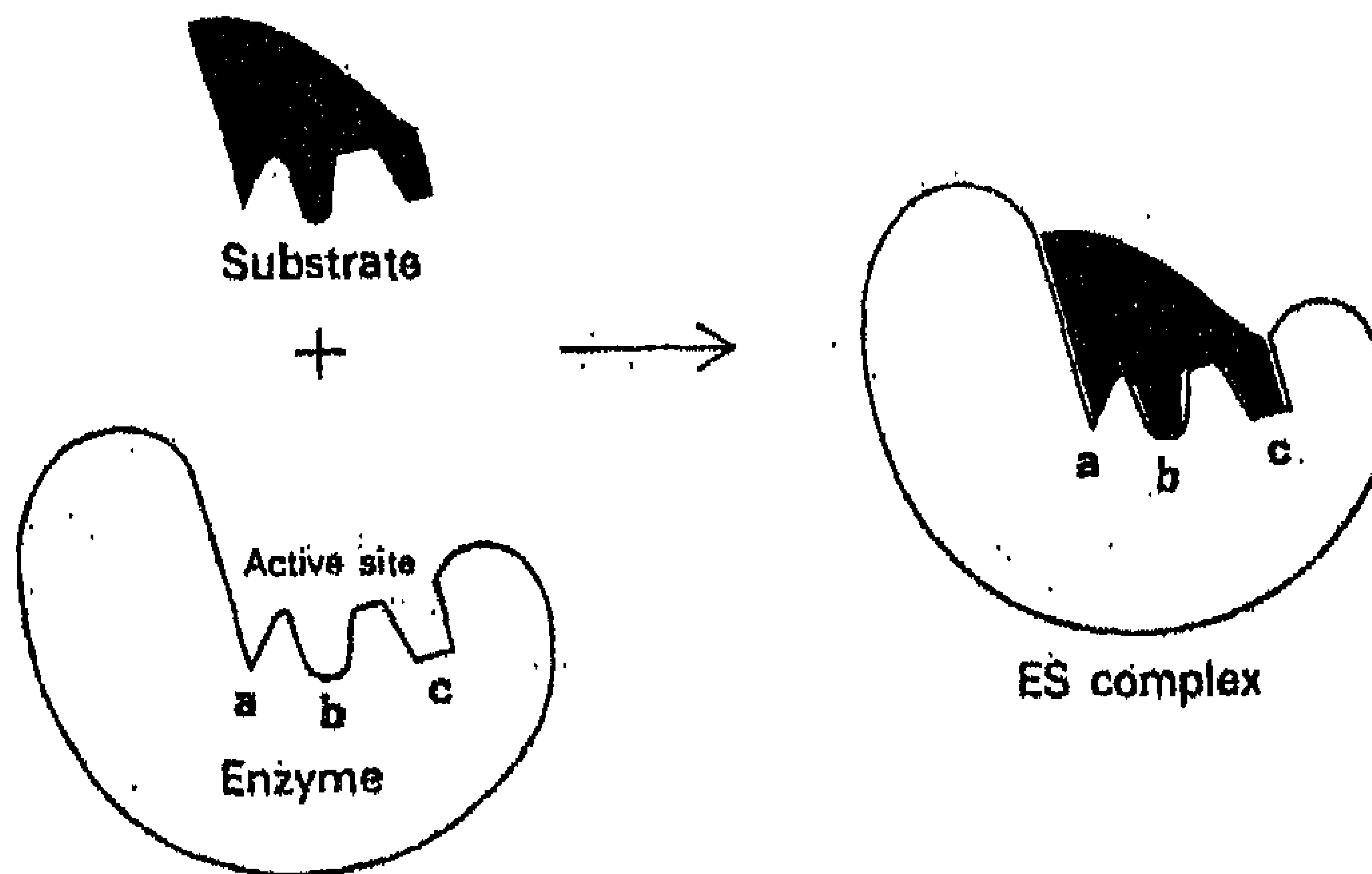
علم الأنزيمات حديث نسبيا ابتدئ به في أوائل القرن التاسع عشر إلا أن التطور الكبير فيه لم يحصل حتى العقود الخمسة الماضية .

لقد عرفت بعض الظواهر مثل التخمر والهضم منذ زمن بعيد إلا أن تمييز الأنزيم لم يتم حتى عام 1833 من قبل Persoz &Payen عندما لاحظا بأن الراسب الناتج عن المعاملة بالكحول لخلاصة الشعير المنبت والمنقع في الماء Malt يحوي مادة تتلف بالحرارة Thermolabile لها القدرة على تحويل النشاء إلى سكر، تسمى هذه المادة الآن Amylase ولقد أسماها مكتشفاها Diastase لقدرتها على تكون دكسترينات Dextrins ذائبة من الأغلفة غير الذائبة لحبيبات النشاء .

وعند منتصف القرن التاسع عشر معرفة بعض الأنزيمات مثل الببسين pepsin وoxidase polyphenol وperoxidase وInvertase وفي عام 1855 وصف Schoenbino أنزيما peroxidase في النباتات يؤدي إلى تحول محلول صمغ الكوياك Gum guaiac من اللون الأزرق إلى البني عند وجود بروكسيد الهيدروجين .وفي عام 1856 أشار Achoenbein إلى أنزيم آخر polyphenol Oxidase في الفطر يعمل بوجود الأوكسجين الجزيئي على أكسدة بعض المركبات .وكما اكتشف Berthelot عام 1860 أنزيما في الخميرة سمي Invertase لقدرته على تغيير اتجاه التدوير البصري لمحلول السكروز بتحليله مائيا إلى كلوكوز وفركتوز، واعقب ذلك اكتشاف العديد من الأنزيمات الأخرى في النصف الثاني من القرن التاسع عشر .وفي عام 1878 أطلق Kuhne اسم Enzyme (بالاغريقية في الخميرة) وأشار إلى أن هذه التسمية لاتحدد بالمادة (Inver- tase) Invertin الموجودة في الخميرة فحسب وإنما تشمل ما موجود في كائنات أخرى مثل أنزيم الببسين والتربسين. ولقد نجح Buchner عام 1897 في الحصول على مستخلص من الخميرة له القدرة على التخمير Fermentation

بمعزل من الخلية الحية وبذلك توصل إلى حل النزاع القائم بين Justus Liebig وLouis Pasteur إذا اعتقد الأول بأن التخمرات والعمليات المشابهة تحصل نتيجة لفعل مواد كيميائية بينما اصر باستور وجماعته على أن التخمر لا يمكن أن يتم دون وجود خلايا حية.

ولقد كان للكيميائي الألماني Emil Fischer دور كبير في فهم آلية التفاعلات الأنزيمية فلقد أعلن فرضية القفل والمفتاح Lock and Key عام 1984 لتأثر الأنزيم وركيزته Substrate والتي تفسر الخصوصية الأنزيمية Enzyme- specificity والعلاقة الفراغية الوطيدة بين الأنزيم والركيزة (شكل 2-1).



شكل 2-1 مخطط لتمثيل فرضية القفل والمفتاح للعالم Emil Fisher والتي تصف تأثر الأنزيم والركيزة لتكوين معقد (أنزيم ركيزة)

نصت فرضية فيشر على ضرورة توافق السمات السطحية للأنزيم والركيزة لتكوين معقد. "أنزيم- ركيزة" وهذا يشير ضمنا إلى أن الأنزيم يستطيع الارتباط بعدد محدود من الركائز وبعبارة أخرى لكل أنزيم خصوصية Specificity للركيزة.

ولقد شهدت بداية القرن العشرين تطور الطرق الكمية لتقدير الفعالية الأنزيمية وتنقية بعض الأنزيمات وفي عام 1902 اقترح كل من Brown , Henri بصورة مستقلة بأن منحنى التشبع Ssturation curve الذي يصف العلاقة بين سرعة التفاعل الأنزيمي وكمية الركيزة المضافة إلى كمية ثابتة من الأنزيم (شكل 2-2) ناتج عن تكوين مركب وسطي وهو مقعد الأنزيم- الركيزة.

وفي عام 1913 اشتق Michaelis وMenten معادلتهما المشهورة التي تصف كميا منحني التشبع أعلاه.

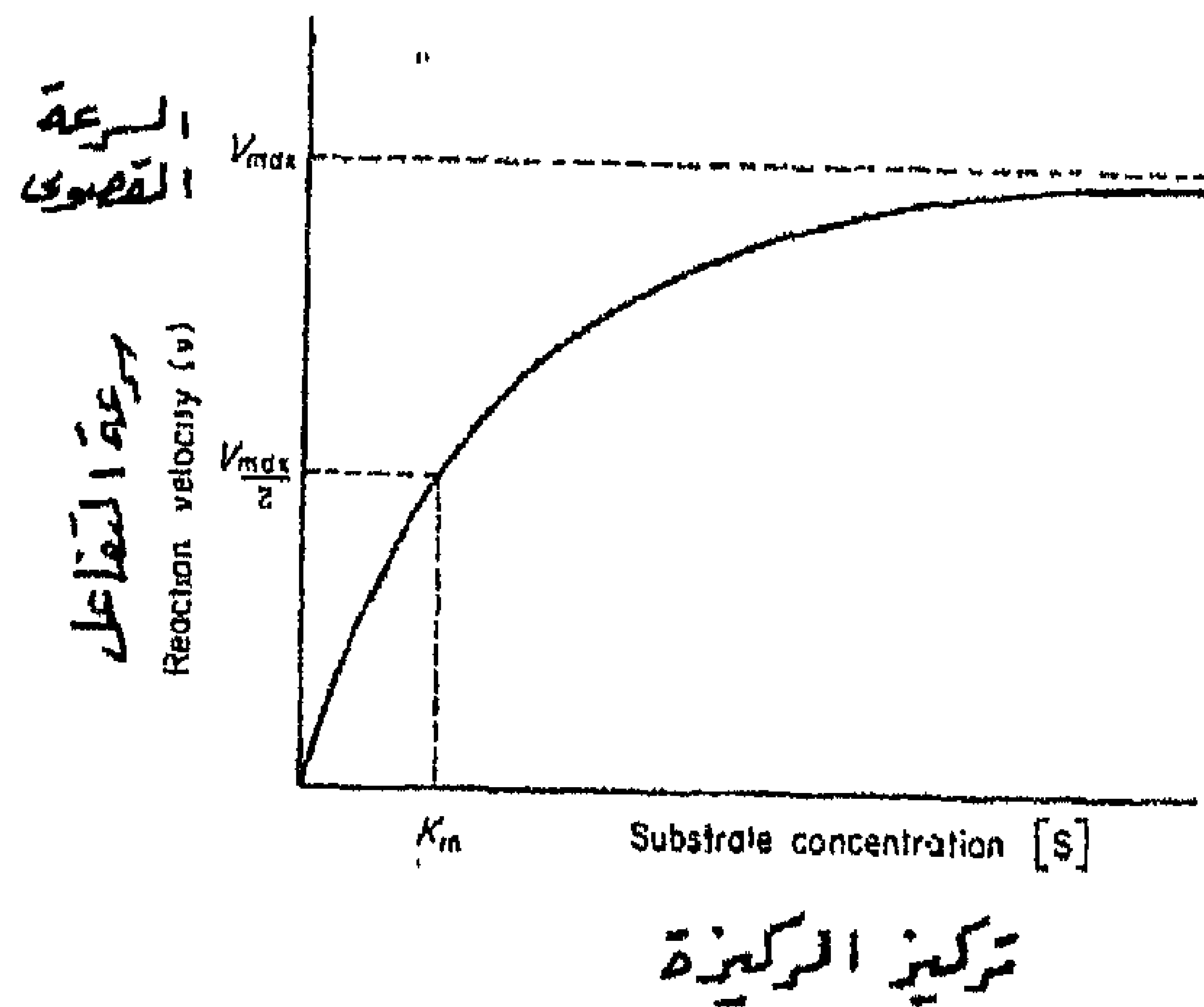
$$V = \frac{V_{max}\,(s)}{K_m + (s)} \qquad (1)$$

V= السرعة الأولية للتفاعل

V max= السرعة القصوى وتحصل عند تشبع الأنزيم بالركيزة

(S) = تركيز الركيزة

Km= تركيز الركيزة عندما تكون V= 0.5Vmax



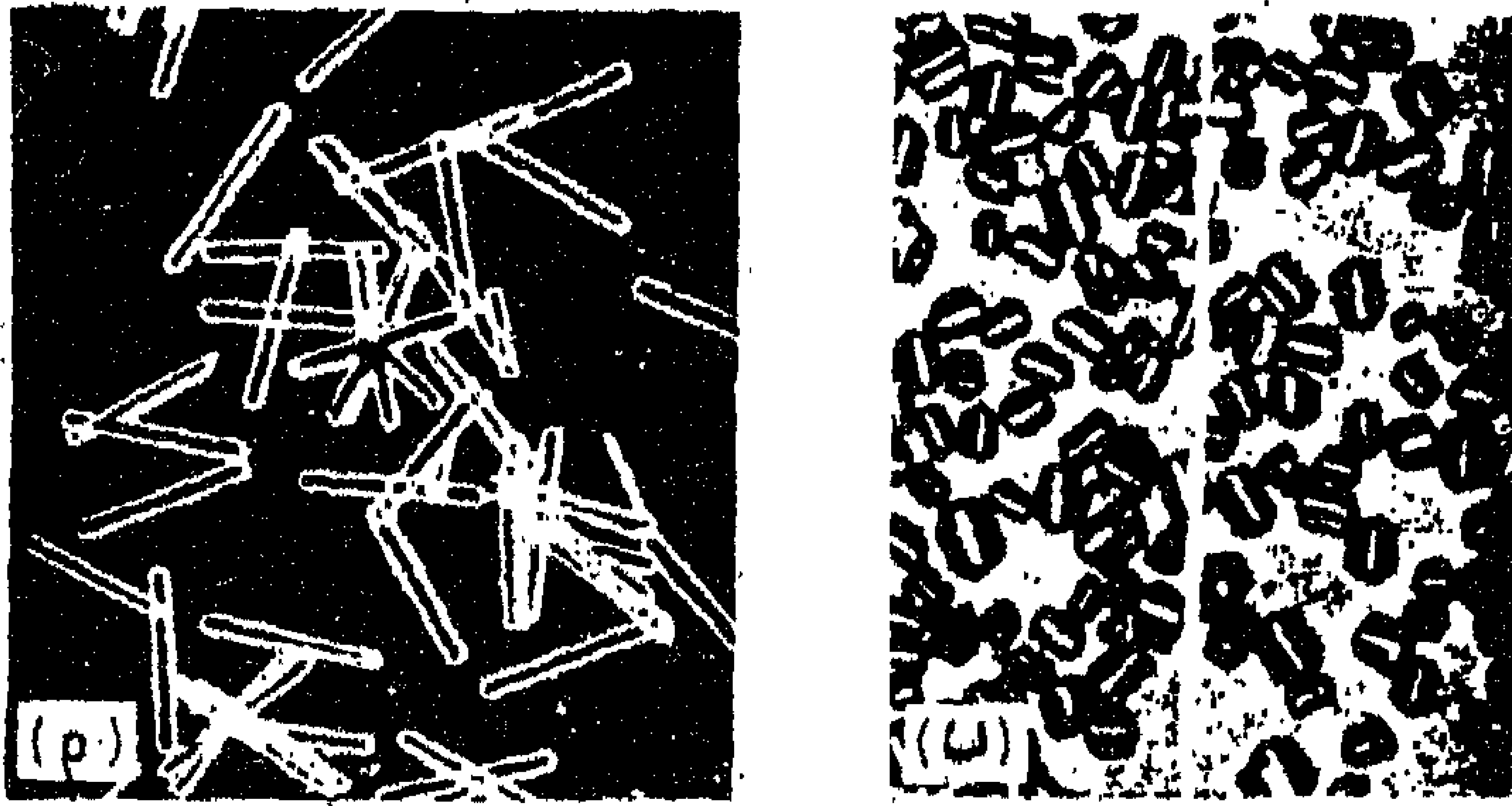
شكل 2-2 العلاقة بين تركيز الركيزة (S) والسرعة الأولية للتفاعل v للتفاعل الأنزيمي

عندما يكون (S) = K_m عندئذ $v = \frac{1}{2} V_{max}$

بدأت تنقية الأنزيمات بعد عام 1920 وكان willstatter وجماعته الرائدين الأوائل في الفترة 1928-1922 وعلى الرغم من أن التنقية التامة لم تحقق حينئذ إلا أنه أمكن تنقية أنزيم البيروكسداز إلى درجة أن الأنزيم المتبقي أظهر فعالية أنزيمية واضحة في تراكيز بروتينية أدنى ما يمكن تحسسها مما حدا بـ Willstatter إلى الإعتقاد بأن الأنزيمات ليست بروتينات وبأنه عند وجود الأخيرة فإنها تعمل فقط كحوامل للأنزيمات.

تحققت إحدى أهم الخطوات في تاريخ علم الأنزيمات عام 1926 عندما نجح J.B Sumner في جامعة Cornell في تنقية الأنزيم يورياز Urease. إلا أن تثمين ما حققه Sumner كان بطيئا ذلك لأن آراء Willstatter وجماعته سيطرت على حقل الكيمياء الحياتية حينئذ وتبعهم الكثيرون في الإعتقاد بأن الأنزيمات ليست بروتينات وفي عام 1930 عبر الكيميائي الحياتي العبقري J.P.S. Haldane عن رأيه إذ ذكر أنه باستثناء أنزيم اليورياز للعالم Sumner فإن الطبيعة الكيميائية للأنزيمات تكاد تكون مجهولة ولم يقتنع الباحثون آنذاك بحقيقية الطبيعة البروتينية لليورياز حتى عام 1929 ولقد حاز Sumner على جائزة نوبل Nobel بعدئذ لما قدمه لعلم الأنزيمات.

شهدت الأعوام التالية للثلاثينات تقدما كبيرا في تنقية الأنزيمات وخصوصا من قبل الفريق Northropو kunitz و Herriott و Anson في مؤسسة روكفلر Rockefeller إذ تم تنقية بعض الأنزيمات مثل التريسين Trypsin والكيموتربسين Chymotrypsin والكربوكس ببتداز (Carboxypeptidase A)A وفي الوقت الحاضر هناك تقريرات تشير إلى بلورة حوالي 200 أنزيما ويوضح الشكل (2-3) بلورات أنزيمي التريسين والالفا-اميلاز اللعابي (α. Amylase).



شكل 2- 3 صور في المجهر الضوئي لأنزيمات بلورية:

أ. أنزيم التربسين **Trypsin** المستخلص من البنكرياس

ب. الفا - اميلاز **α - Amylase** اللعابي

ولقد تقدم علم الأنزيمات تقدما ملحوظا منذ عام 1940 بحيث أصبح من الصعوبة بمكان ذكر جميع من أسهم في هذا المجال إلا أنه لا يمكن إنهاء هذه اللمحة التاريخية الوجيزة دون ذكر فرضية كوشلاند Koshland عام 1959 المسماة التوافق المحرض Induced fit والتي وصفت ارتباط الأنزيم بالركيزة. فعلى الرغم من أنها احتفظت بفرضية تكوين معقد ذي خصوصية فراغية Stereospecific بين الأنزيم والركيزة إلا أنها رفضت فكرة موقع نشط Active Site ذي تركيب صلب وشاكلة Configuration متممة للركيزة حتى في غيابها. واقترحت بأن وجود الركيزة بالقرب من الموقع النشط قد يحرض بعض التغيرات فيه بحيث يصبح أكثر ملاءمة للتطابق مع الركيزة إذ تتخذ المجاميع- ذات العلاقة بتحول الركيزة إلى ناتج – مواقعا مناسبة. إن مرونة الموقع النشط ودرجة تكيفه تختلفان تبعا للأنزيم.

وكان أول تقدم مفاجيء في تعيين التسلسل الأولي للأحماض الأمينية في البروتينات عام 1955 حينما سجل Sanger وجماعته التسلسل الأولي التام لهورمون الأنسولين Insulin ذي الوزن الجزيئي (6000). ولقد أمكن تعيين

التركيب الأولي لأول أنزيم- الريبونيو كلياز Ribonuclease ذي الوزن الجزيئي 13683- عام 1960 وتلا ذلك عدة أنزيمات بما في ذلك الكيموتربسين واللايسوزيم Lysozyme والتربسين والبابين Papain والكربوكسي ببتيداز A.

تطورالفحص البلوري بالأشعة السينية α- ray crystallography خلال الثلاثينات واستخدم لتعيين التراكيب ثلاثية الأبعاد للببتيدات. إلا أن مهمة إيجاد التراكيب الأنزيمية اثبت صعوبة تحقيقها حتى دخول الحاسب الإلكتروني ولم يتم معرفة التركيب ثلاثي الأبعاد لأول أنزيم- الرايبونيوكلياز- حتى عام 1967.

وفي عام 1969 أمكن وللمرة الأولى تحضير أنزيم مختبريا على أيدي جماعتين وكان الأنزيم المحضر ريبونيوكلياز Ribonuclease.

صاحب التقدم في الخصائص الفيزيوكيميائية للأنزيمات تطورالمعالجات الحركية للأنظمة الأنزيمية ولقد وصفت حركيات الأنزيمات بصورة دقيقة من خلال أعمال

laidler و Alberty و Cleland و Dalziel و Wong و Hanes وغيرهم، إلا أنه لم يتم معالجة حركيات التفاعلات الأنزيمية متعددة الركائز أو متعددة الخطوات حتى بعد عام 1960.

2-3 الخصائص العامة للأنزيمات

الأنزيمات بروتينات:

تم توكيد طبيعة الأنزيم البروتينية بعد عام 1930 وكغيرها من البروتينات، تتأثر الأنزيمات بالعوامل التي تؤدي إلى تمسخ Denaturation البروتينات وكمثال الحرارة والحوامض القوية والقواعد القوية والمعادن الثقيلة والمطهرات Detergents. تعطي الأنزيمات كشوفات موجبة لجميع الإختبارات

النموذجية للبروتينات مثل اختبارات Biuret و Millons و Hopkins – Cole و Sakaguchi الدالة على الأصرة الببتيدية والثايروسين Tyrosine والتريتوفان Tryptophan والارجنين Arginine على التوالي.

ولقد أكدت دراسات الأشعة السينية للبلورات الأنزيمية α- ray Crystallography تكوينها من أحماض أمينية مرتبطة ببعضها بأواصر ببتيدية.

ليست جميع الأنزيمات بروتينات. إذ تم مؤخراً اكتشاف جزئيات حامض نووي ريبي RNA بفعالية أنزيمية. إن هذا الإكتشاف يغير من الرأي السائد بأن جميع الأنزيمات ذات طبيعة بروتينية (للمزيد من التفاصيل راجع المصدر 29).

تحوي بعض الأنزيمات مكونات غير بروتينية

ينتج عن التحلل المائي لبعض الأنزيمات مزيج من الأحماض الأمينية فقط بينما تعطي أنزيمات أخرى بعد معاملتها موادا غير بروتينية مثل الكربوهيدرات والفسفات والشحوم وأيونات المعادن أو جزيئات عضوية صغيرة. يسمى الجزء البروتيني للأنزيم صميم الأنزيم Apoenzyme ذي الوزن الجزيئي (39600) وتميم العامل Cofactor وهو المركب Ferriprotoporphyrin III ذو الوزن الجزيئي 652. لا يمتلك صميم الأنزيم بمفرده فعالية أنزيمية وكذلك الحال مع تميم العامل Ferriproto porphyrin III الذي يعزى له 0.001٪ من فعالية الأنزيم الأصلية. ويمكن ربط صميم الأنزيم بتميم العامل لتكوين الأنزيم التام Holoenzyme الذي يستعيد الفعالية الأنزيمية كاملة.

الأنزيمات محفزات بروتينية :

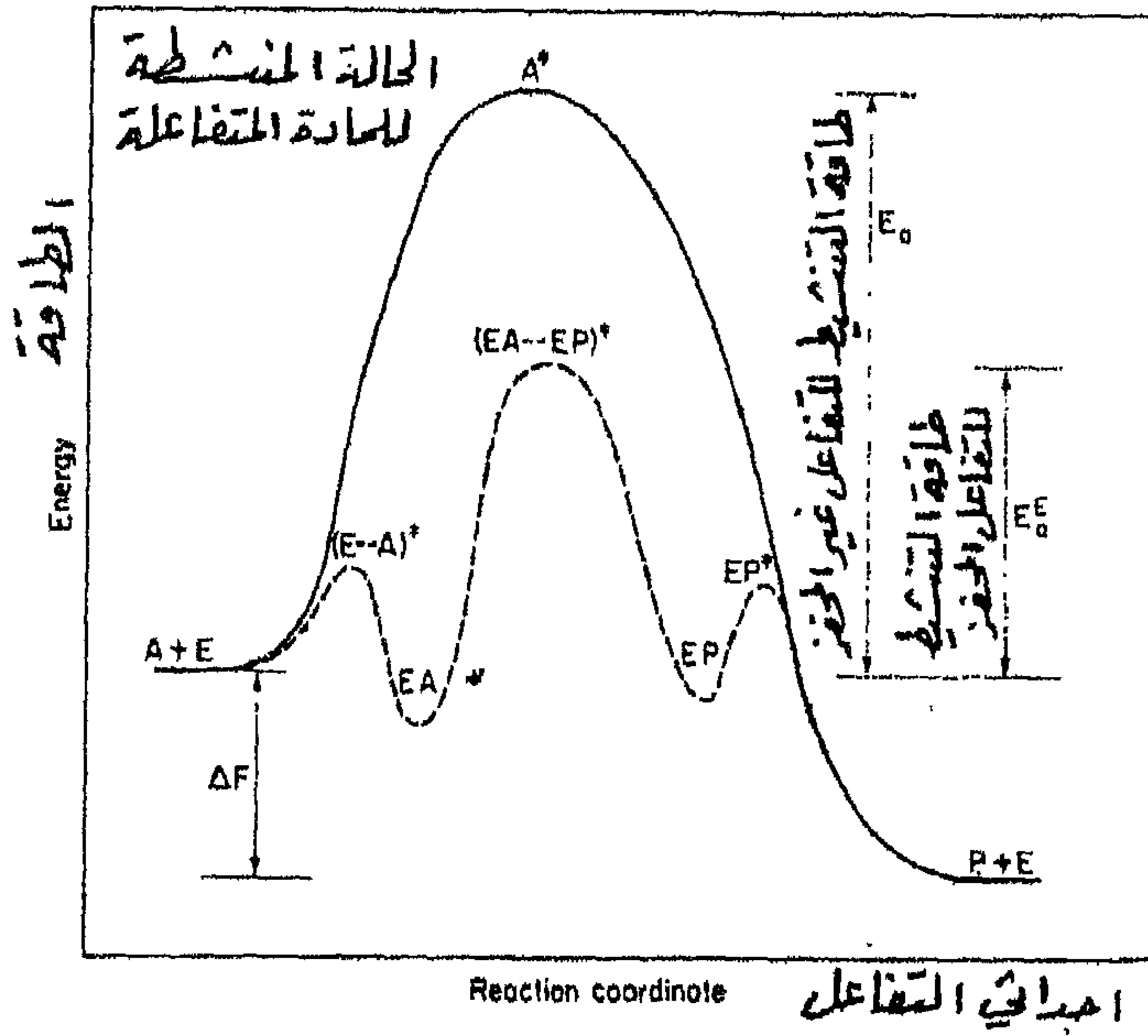
المحفز مادة تؤثر في سرعة التفاعلات الكيميائية دون تحولها إلى ناتج. في الظروف المثالية لا يستهلك المحفز إلا أن هذا لا يصح إلا على الأنزيمات المستقرة Stable تماما إذ تبقى تراكيزها الفعالة ثابتة خلال التفاعل وينطبق ما جاء أعلاه على بعض المحفزات اللاعضوية دون غيرها فمثلا يتسمم البوليديوم polladium والبلاتنوم Platinum في بعض التفاعلات المحفزة.

الأنزيمات كغيرها من المحفزات تسرع الوصل إلى حالة الموازنة للتفاعل العكوس Reversible reaction بزيادة ثابتي السرعة للتفاعلين متعاكسي الإتجاه دون تغيير في نسبتهما وهذا يعود إلى خفض طاقة التنشيط (الحاجز الطاقي للتفاعل) للتفاعل المحفز عنها للتفاعل غير المحفز (شكل 2-4)



$$A + B \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} C + D \qquad (1$$

وهكذا في التفاعل أعلاه تبقى النسبة $\frac{k_1}{k_{-1}}$ ثابتة وبذلك لا يتغير ثابت التوازن K_{eq} للتفاعل $\left(\frac{k_1}{k_{-1}} = K_{eq}\right)$ ولهذه الخاصية الأنزيمية تتسب زيادة سرعة الوصول إلى حالة الموازنة في درجات حرارية اوطأ مما تتطلبه التفاعلات ذاتها فيما لو تمت بدون الأنزيمات.



شكل (2-4) سيماء التفاعل الأنزيمي مقارنة بالتفاعل عبر المحفز. لاحظ بأن الفرق في الطاقة الحرة (AG) بين المادة المتفاعلة (A) والناتج (P) لم يتغير بوجود الأنزيم وبذلك لا يغير التفاعل الأنزيمي ثابت التوازن للتفاعل يمثل EA معقد الأنزيم- الركيزة. Ep، معقد الأنزيم الناتج +A، (E-A)، Ep الحالات المنشطة.

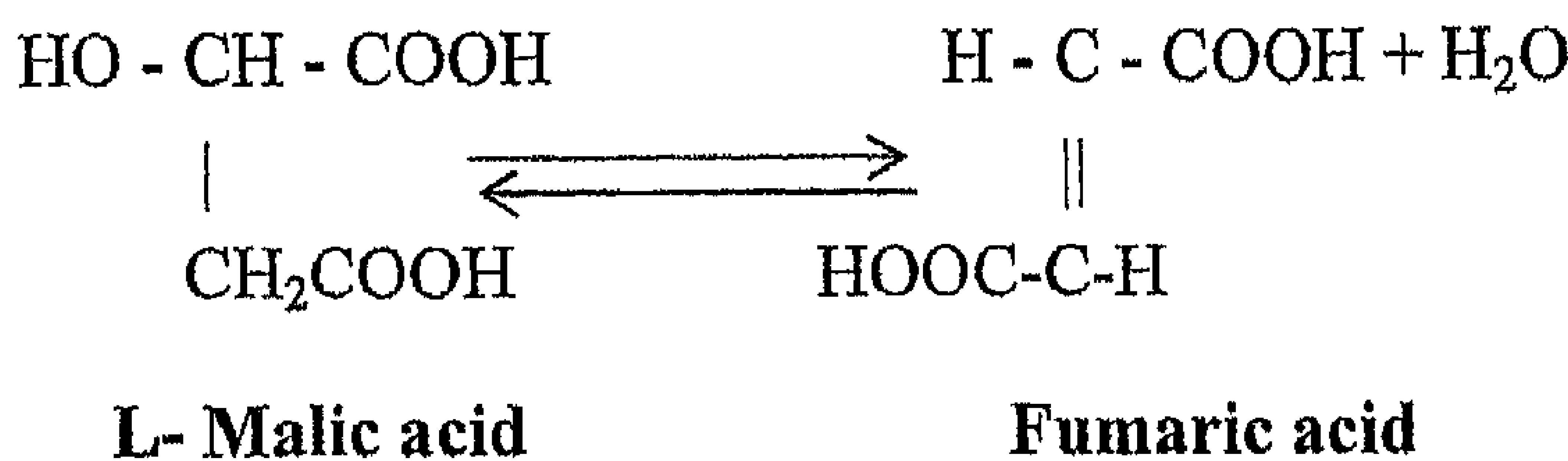
تظهر الأنزيمات تأثيرها بتراكيز ضئيلة جدا وتبلغ التراكيز المستخدمة في الزجاج In Vitro 10^{-1} – 10^{-8} مولار، إلا أن التراكيز الموضعية للأنزيمات في المنظومات الحية قد تكون أعلى من ذلك بكثير وتقاس كفاءة التحفيز الأنزيمي برقم التحول Turnover number.

يعرض رقم التحويل بعدد مولات الركيزة المتحولة إلى ناتج لكل مول موقع نشط للأنزيم في الثانية (أو في الدقيقة) تحت ظروف يكون فيها الأنزيم مشبعا بالركيزة. تختلف أرقام التحول للأنزيمات من 10^{-1}–10^{2} ثانية$^{-1}$ لأنزيمات التحلل

المائي إلى $10^{6}-10^{7}$ ثانية لبعض أنزيمات الأكسدة ويكون رقم التحول حالة للرقم الهدروجيني (PH) ودرجة الحرارة وظروف التفاعل الأخرى.

الأنزيمات محفزات ذات خصوصية عالية تجاه ركائزها

تحفز بعض الأنزيمات تفاعلا واحدا فقط محددا بطقم Set من المواد المتفاعلة وكمثال التحول بين الفيومارات Fumarate والمالات Malate المحفز بالأنزيم فيوماراز Fumarase



وتسمى أنزيمات من هذا النوع ذات تخصص مطلق.

لا يعمل أنزيم الفيوماراز على الايزومر الفراغي Stereoisomer للفيومارات وهو Maleate ولا على D – Malate.

تكون بعض الأنزيمات أقل خصوصية فمثلا تحفز أنزيمات البروتياز التحلل المائي للأصرة الببتيدية ولكنها تظهر خصوصية تجاه الأواصر التي تكونها الأحماض المختلفة وبذلك تكون هذه الأنزيمات (متخصصة للمجموعة). يحفز أنزيم التريسين Trypsin مثلا التحلل المائي للأواصر الببتيدية التي تساهم بمجموعة الكربوكسيل فيها الأحماض الأمينية القاعدية مثل الأرجنين واللايسين فيما يحلل مائيا أنزيم α- Chymotrypsin الأواصر الببتيدية إذا كان مصدر مجموعة الكربونيل فيها أحد الأحماض الأروماتية L -Tyrosine أو L–

Phenylalaine أو Lysine-L. تظهر أنزيمات البروتياز هذه خصوصية فراغية تامة أيضاً لإنها تعمل فقط على الأواصر الببتيدية الناتجة عن الأحماض الأمينية (L) ولا تهاجم الأواصر الناتجة عن الأحماض (D).

الأنزيمات ذات خصوصية أيضاً لنموالتفاعل المحفز فمثلا يحفز أنزيم الفيومارازإماهه Dehydration وإزالة الماء Dehydration من الركائز بينما تحفز أنزيمات البروتياز التحلل المائي للأصرة الببتيدية فقط ولا يمكن أن تحفز نمطا آخر من التفاعلات وكمثال أكسدة واختزال او إزالة كربوكسيل وما إلى ذلك.

تعزى الخصوصية الأنزيمية إلى ضرورة تكون معقد أنزيم- ركيزة كخطوة أولى في التفاعل المحفز وتتعين الخصوصية بالمتطلبات اللازمة لإرتباط الركيزة في الموقع النشط الأنزيم و (أو) المتطلبات الضرورية لتحول الركيزة- بعد ارتباطها- إلى ناتج وسوف تتوضح الكثير من الأمثلة عند تناولنا للأنزيمات المختلفة.

2-4 التصنيف والتسمية النظامية للأنزيمات

أعطيت الأنزيمات عند أول اكتشافها تسميات معتمدة على أسس مختلفة فمثلا سمي الأنزيم المكتشف من قبل warbury و Christian عام1932 والحاوي على الريبوفلافين Riob flavin اسم الأنزيم الأصفر كما سمي أنزيم التحلل المائي للبروتينات papain بهذا الأسم نسبة إلى نوع Species النبات الذي عزل منه Carica Papaya ثم سميت العديد من الأنزيمات باسم الركائز التي تعمل عليها مع إضافة المقطع (ase) فمثلا Urease يحفز التحلل المائي لليوريا إلى أمونيا CO_2 وphosphatase يحفز التحلل المائي لاسترات الفوسفات وهنا برزت مشكلة أخرى فمثلا الأنزيمات ببسين وتريبسين والفا- كيموتريبسين وكربوكسي ببتيداز-A تعمل جميعا على البروتينات ولهذا تحمل جميعها اسم بروتياز protease ولهذا السبب أعطيت تسميات اعتباطية. وبزيادة عدد الأنزيمات المكتشفة برزت مشاكل عديدة. ولتجنب الفوضى والإلتباس في التسمية وضعت هيئة الأنزيمات Enzyme Commission 1961 معتمدا تقسيم الأنزيمات إلى مجاميع نسبة إلى

نمط التفاعل المحفز وسميت الأنزيمات تبعا لنمط التفاعلات المحفزة وأسماء الركائز التي تعمل عليها.

2-4-1 قواعد التسمية :

أ- ينتهي اسم الأنزيم بالمقطع (ase-) وهذا ينطبق فقط على الأنزيمات المنفردة ولا يشمل الأنزيمات التي تعمل بتسلسل محدد لتكوين نظام أنزيمي يحفز تفاعلا اجماليا وكمثال يضاف المقطع (ase-) إلى نهاية الإسم النظامي للأنزيم المعروف بالإسم الشائع Succinate dehydrogenase والمحفز للتحول بين السكسنات والفيومارات بينما لا يعطي للنظام الأنزيمي Succinate oxidase الذي يشتمل على عدة أنزيمات تحفز نقل الإلكترونات من السكسنات إلى الأوكسجين الجزيئي.

ب- تكون المعادلة التي تصف التفاعل الإجمالي المحفز بالأنزيم أساساً للتسمية ولا تؤخذ بنظر الإعتبار المراحل الوسطية للتفاعل. وعند تحفيز تفاعلات عكوسة يعتمد اتجاه واحد فقط اساساً لتسمية الأنزيمات التي تحفز ذلك النمط من التفاعلات وكمثال تفاعلات الأكسدة والاختزال. يحفز الأنزيم المعروف بالإسم الشائع dehydrogenase Alcohol التفاعل العكسي الآتي:



$$\text{Ethanol} + \text{NAD}+ \rightleftharpoons \text{Acetalehyde} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

ويسمى بإسم الركيزة المختزلة وتميم العامل cofactor المؤكسد وبهذا يصبح: alcohol oxidoreductase NAD وهكذا تسمى جميع أنزيمات الأكسدة المرجعة oxidoreductases. ولقد إقترحت اللجنة إستخدام NAD أو NADP وليس +NAD أو +NAP.

ج- يعطى لكل أنزيم نظام تسمية ذو ثلاث علامات مميزة وهي الإسم النظامي والإسم الشائع والرقم. يتكون الإسم النظامي عادة من جزأين يتكون الأول

من إسم الركيزة (أو الركيزتين وتفصل بنقطتين: للتفاعلات ثنائية الركيزة) والثاني يشير إلى طبيعة التفاعل المحفز (أكسدة وإختزال أو تحلل مائي أو نقل مجموعة...الخ) وينتهي بالمقطع ase- وعندما يشتمل التفاعل الإجمالي على نوعين من التفاعلات وكمثال إزالة المثيل التأكسدية oxidative demethylation، يؤشر على النمط الثاني للتفاعل بمعلومات توضع داخل أقواس وكمثال:

Sarcosine: oxygen oxidoerductase (demethylating)

الإسم الشائع Trivial name:

هو الإسم المستخدم عادة للأنزيم وكمثال يورياز Urease وألفا-أميلاز Amylase و Cellulase وpapain و pepsin. وعندما يكون الأنزيم الموضوع الرئيسي لمقالة أو بحث يجب أن يعطى إسمه النظامي ورقمه ومصدره عند أول ذكره فمثلاً الأنزيم المحفز لأكسدة الكحول بوجود +NAD يعطى التسمية الآتية: alcohol NAD oxiodoreductose (Ec.1.1.11) from yeast ويعد ذلك يضاف الإسم الشائع alcohol dehydrogenase وإذا لم يكن الأنزيم الموضوع الرئيسي في الدراسة عندئذ يكتفي بذكر إسمه الشائع وتم رقم شفرته داخل أقواس ويكون هذا للمثال أعلاه (yeast Alcohol dehyorgenase (Ec. 1.1.1.1.

يأتي رقم الشيفرة Code number مباشرة من نظام التصنيف ويتكون كل رقم شفرة من أربعة أرقام :

الرقم الأول (1إلى 6) يدل على الصنف الرئيسي الذي ينتمي إليه الأنزيم وهناك ستة أصناف رئيسة وهي :

1. oxidoreductases (أنزيمات الأكسدة المرجعة)

2. Transferases (الأنزيمات الناقلة)

3. Hydrolases (أنزيمات التحلل المائي)

4. Lyases (أنزيمات اللياز)

5. Isomerases (أنزيمات الإيزومراز)

6. Ligases (synthetases) (أنزيمات الليكاز أو التخليق)

وسوف نتناول فيما بعد بشيء من التفصيل بعض هذه المجاميع .

يؤشر الرقم الثاني في الشفرة الصنف الثانوي فمثلا لأنزيمات الأكسدة المرجعة يوضح طبيعة المجموعة في المركب الواهب للالكترونيات أو الهيدروجين والتي تعاني أكسدة فمثلا يشير الرقم الثاني 1 إلى مجموعة كحول للتفاعل المحفز بالأنزيم Alcohol dehydrogenase وبذلك يصبح أول رقمين للشفرة (101) ويشير الرقم 2 إلى مجموعة كيتو أو الدهايد (1.2) وللأنزيمات الناقلة يؤشر الرقم الثاني طبيعة المجموعة المنقولة فمثلا مجموعة حاوية على ذرة كربون واحدة (2.1) أو ثمالة Residue كيتونية أو الدهايدية (2.2) أو مجاميع أسيل Acyl (2.3) ولأنزيمات التحلل المائي يشير الرقم الثاني إلى نوع الآصرة التي يتم تحللها مثلا إستر (3.1) أو كلايكوسيل (3.2) أو ببتيد (3.4) .

وأما الرقم الثالث للشفرة فيؤشر فرع الصنف الثانوي فمثلاً... للصنف الأول Oxidoreductases يؤشر الرقم الثالث نوع المركب المتقبل للالكترونيات أو الهيدروجين فإذا كان NAD أصبح الرقم (1.1.1) وإذا كان Cytochrome يعطي الرقم 3 للأوكسجين الجزيئي (1.1.3) و وهكذا للأنزيمات الناقلة، يشير الرقم الثالث إلى الطبيعة الكيميائية للمجموعة المنقولة وكمثال إذا كانت المجموعة الحاوية على ذرة كربون مجموعة مثيل أعطي الأنزيم الناقل لها الرقم (2.1.1) وإذا كانت مجموعة كربوكسيل أصبح الرقم (2.1.3) .

الرقم الرابع في الشفرة هو رقم التسلسل للأنزيم في فرع الصنف الثانوي الذي ينتمي إليه فمثلا Ec 1.1.1.1 يمثل الأنزيم Alcohol dehyrogenase والرقم Ec 1.1.1.2 يمثل الأنزيم Alcohol dehyrogenase (NADP) .

Alcohol + NADP+ = Aldehyde + NADPH + H+

ويمثل الرقم Ec 1.1.1.3 الأنزيم Homoserine dehydrogenase

Homoserine + NAD+ = L- Aspartate β- semialdehyde+ NADPH+H+

2-5 أهمية علم الأنزيمات في علم الأغذية :

على الرغم من ممارسة إستخدام الأنزيمات على مدى عدة قرون، لتحقيق التغيرات المطلوبة على الأغذية، إلا أن طبيعة المحفزات أو التفاعلات ذات العلاقة، بقيت غير معروفة على وجه الدقة حتى وقت قريب . ومن الأمثلة القديمة لاستخدام الأنزيمات، إستعمال الشعير المنبت بالنقع في الماء Malted barely لتحولات النشاء اللازمة للاختمار. وإضافة اللعاب إلى المنتجات النشوية بهدف تخمرها لتحضير المشروبات الكحولية المقطرة Liquors وتغليف اللحوم بأوراق مخدشة لشجرة اليايا ليسهل مضغها في بادي الأمر، تم دراسة الأنزيمات ذات العلاقة بالهضم والتخمر وتفاعلات التحلل المائي للأغذية وأولى علماء الأغذية عناية خاصة للأنزيمات المسببة للتغيرات المتلفة للأغذية . ومن هذه الأنزيمات، الأنزيمات البكتينية pectic enzymes وpolyphenol oxidase ولسوء الحظ لم تعط الأنزيمات المفيدة في التصنيع الغذائي، الأهمية الكافية .

وسوف نتناول فيمايلي أهمية الأنزيمات في الجوانب المختلفة لعلم الأغذية.

2-5-1 دور الأنزيمات في حفظ وتصنيع الأغذية :

تشتمل عملية النمو على عدة تفاعلات أنزيمية مهمة ،وتتغير نوع وكمية الأنزيمات بإستمرار خلال مراحل التطور والنضج، وتختلف هذه بإختلاف نوع العضو والنسيج والخلايا . إن إي خلل في التكوين الأنزيمي يؤدي إلى حالة غير طبيعية وقد تنتج عنها أغذية غير مرغوب فيها .وعند جمع مواد من مصادر حيوية . بهدف إستخدامها كغذاء، فإن التفاعلات الأنزيمية تستمر فيها حتى تنفذ الركيزة Substrate أو بتغير الرقم الهيدروجيني PH بحيث يصبح غير ملائم للفعالية الأنزيمية . فمثلا أنزيمات دورة كريبس Krebs وسلسلة نقل الالكترونات Electron transpot chain تصبح غير فعالة حالا بعد موت الخلية الحية بسبب عدم توفر الركيزة النهائية " الأوكسجين " . وإن أنزيمات تحلل السكر Glycolysis التي تعمل بمعزل عن الأوكسجين، وتستمر في عملها على الكلايكوجين Glycogen والكلوكوز لإنتاج حامض اللالاكتيك حتى تنتهي فعاليتها بسبب استعلاك الركائز أو لتغير الرقم الهيدروجيني إلى قيمة غير ملائمة . أما أنزيمات التحلل المائي وهي أنزيمات التحلل المائي للبروتينات Proteases والاسترات Esterases والفسفات العضوية Phosphatases والكلايكوسيدات Glycosidases فإن فعاليتها تستمر على المكونات الخلوية مدة طويلة بعد موت الخلية وفي الواقع فإن فعالية هذه الأنزيمات غالبا ماتزداد بسبب التلف التدريجي للتنظيم الخلوي. ونظرا للتوقف الكبير في تفاعلات الابتناء Anabolic reactions

بعد موت الخلية وإستمرار تعجيل تفاعلات التقويض Catabolic تكون النتيجة تلف النسيج التدريجي.وقد لايكون هذا التلف سيئا إذ قد يسهم في نكهة أو صفة مميزة للمادة الغذائية.

إن التفاصيل الدقيقة لتغيرات الفعالية الأنزيمية في معظم الفواكه قيد النضوج، مختلفة عنها في الأنسجة الحيوانية. فعند النضوج تزداد كمية وفعالية

بعض الأنزيمات. كما تزداد سرعة التنفس ويتحول النشاء إلى سكريات ويحصل نكوص degradation للكلوروفيل ويزداد حجم الخلايا بسرعة وتعد جميع هذه التغيرات مفيدة للفواكه بينما يكون نكوص الكلوروفيل في الخضراوات الخضراء، غير مرغوب فيه وبعد نضوج الفاكهه تستمر وتزداد فعالية أنزيمات التحلل المائي وإذا لم يسيطر عليها تصبح الفاكهة شديدة النضوج overripe وطريقة Mushy أما في الفوصوليا الخضراء الطازجة والبازلاء والذرة فإن التفاعلات المحفزة بالأنزيم المؤكسج للشحوم Lipoxygenase تؤدي إلى فقدان اللون والنكهة .

وللسيطرة على الفعالية الأنزيمية بعد الحصاد، يجب فهم العوامل المؤثرة فيها ومن أهم المتغيرات التي يمكن التعامل معها درجة الحرارة والركيزة .فمثلا يؤدي الخزن في درجات الحرارة المنخفضة إلى ابطاء سرعة الفعاليات الأنزيمية ويؤخر الوقت الذي تصبح فيه نوعية المنتوج غير مقبولة. إلا إن هذا لا يصح لجميع المنتجات الغذائية، فمثلا عند خزن البطاطا في درجات حرارة عالية نسبيا، يتحلل النشأ مائيا إلى ديكسترينات Dextrins ومالتوز واخيرا إلى كلوكوز الذي يؤكسد فيما بعد، وهذا يؤدي إلى رخاوة المنتوج. أما إذا كانت درجة الحرارة واطئة نسبيا فأن أكسدة الكلوكوز تحصل أبطأ من سرعة تحول النشأ إلى سكريات وتصبح البطاط حلوة وبدرجة غير مستساغة أن حزن بعض الأغذية في او بالقرب من الصفر المئوي، قد يؤدي إلى زيادة ملحوظة في الفعالية الأنزيمية وهذا ناتج عن زيادة توفر الركائز للأنزيمات بسبب تركيز الوسط المائي للانسجة بسبب الجفاف أو (و) التلف التام للمكونات الخلوية بسبب البلورات المائية الكبيرة المتكونة عند التجميد البطيء مما يؤدي إلى إذابة بعض الأنزيمات المرتبطة بالاغشية البلازمية. ولهذا يجب أن يتم الخزن فوق الصفر المئوي أو عدة درجات تحته وليس في المدى (صفر – 5 م) الا إذا توافرت الرغبة لزيادة الفعالية الأنزيمية.

وفي الفواكه. تؤدي أنزيمات الأكسدة الى زيادة ملحوظة في التنفس الخلوي وتؤشر بدء عملية النضوج ويمكن خفض فعالية هذه الأنزيمات بخفض درجة الحرارة وتغيير نسب الأوكسجين وCO_2 والنيتروجين في الجو بحيث تقل نسبة الأوكسجين (التكوين الطبيعي للهواء :21٪ أوكسجين، 0.03 ٪ CO_2، 79٪ نيتروجين) ويكون ذلك بزيادة نسبة CO_2 والنيتروجين، ولايفضل استهلاك الأوكسجين كليا للحاجة اليه من قبل بعض عمليات الأكسدة التي يجب ان تستمر بسرع منخفضة للحفاظ على وحدة وسلامة الخلايا. كما أن الخزن في تركيز أوكسيني واطئ يؤدي الى الاسمرار الداخلي للبطاطا وبعض الفواكه الاخرى في حين يفقد البعض الاخر منها نكهته .

ان الطريقتين الرئيستين للسيطرة على الفعالية الأنزيمية في الأغذية هما المعاملة بالحرارة والتجميد.وإذا تمت المعاملة بالحرارة بالطريقة الملائمة. فإنها تؤدي إلى اتلاف جميع الفعاليات الأنزيمية بما في ذلك المتسببة عن الاحياء المجهرية الملوثة.وحيث أن الحرارة متلفة عادة للمواد المسببة للنكهة في الأغذية فإن من الضرورة استخدام اللازم فقط لتحقيق اتلاف الفعاليات الأنزيمية بصورة تامة.وتستعمل فعالية البيروكسيد peroxidase مؤشرا لكفاءة المعاملة الحرارية .فإذا فقدت هذه الفعالية الأنزيمية كليا ،دل ذلك على تلف الأنزيمات الاخرى .وتشكل البيركسيداز وسيلة نافعة لهذا الغرض نظرا لانتشارها في جميع الانسجة النباتية .

أما التجميد فلا يؤدي إلى اتلاف الفعالية الأنزيمية وانما يخفضها وبذلك يطيل من عمر المخزون. وإذا لم يسبق العملية معاملة الغذاء بالماء الحار أو البخار فإن الفعالية الأنزيمية تنشط حال تدفئته.

يوضح الجدول (2-1) بعض الفعاليات الأنزيمية المفيدة والمتلفة للأغذية. وقد يكون من المفيد وجود أنزيم ما في مادة غذائية في حين يشكل وجوده في مادة أخرى ضررا عليها ، وكمثال الأنزيم Polyphenol oxidase.يؤدي هذا

الأنزيم إلى خسائر كبيرة في الموز والتفاح والبطاطا بسبب تفاعلات الاسمرار التي يسببها الا ان وجوده في الشاي والقهوة والزبيب ضروري لنشوء اللون المناسب.

جدول 2-1 بعض الأنزيمات المستخدمة او المقترح استخدامها في الصناعات الغذائية .

الأنزيم	الغذاء	الهدف والفعل
الاميلازات (Amylases)	المعجنات	زيادة محتوى السكر عند الاختمار بواسطة الخميرة. Yeast
	اختمار البيرة	تحول النشأ إلى مالتوز في عملية الاختمار. إزالة التعكر Turbidity الناتج عن النشأ.
	الحبوب	تحويل النشأ إلى ديكسترينات وسكر زيادة امتصاص الماء
	الحلويات	استرجاع السكر من فتات الحلويات. Candy Scraps
	عصير الفواكه	إزالة النشا ليصيبح أكثر فواراً Sparkling
	الهلام	إزالة النش ليصبح أكثر شفافية
	البكتين	يساعد في تحضير البكتين من ثغل التفاحApple pomace
	الخضراوات	التحلل المائي للنشأ وكمثال لجعل البازلاء أكثر ليونة وأسهل مضغاً.
السيليلاز Cellulase	اختمار البيرة	التحلل المائي لجدران الخلايا الكربوهيدراتية المعقدة.
	البن	التحلل المائي للسيليلوز خلال تجفيف الحبوب
Dextran	السكرالسائل	تثخين السائل

الأنزيم	الغذاء	الهدف والفعل
sucrase	المثلجات اللبنية Ice cream	إضافة الديكستران بوصفة عامل تركيز أو بوصفه عاملاً مركزاً
Invertase	العسل الصناعي	تحويل السكروز إلى كلوكوز وفركتوز
Lactase	المثلجات اللبنية	منع تبلور اللاكتوز الذي يسبب التركيب الرملي المحبب
	الحليب	استقرار بروتينات الحليب في الحليب المجمد بإزالة اللاكتوز
Tannase	اختمار البيرة	إزالة عديدات الفينول
الأنزيمات البكتينية النافعة	كاكاو-الشكولا	فعالية التحلل المائي خلال تخمر الكاكاو
	البن	التحلل المائي للطبقة الخارجية الهلامية خلال تخمر الحبوب
	الفواكه	تليينها
	الزيتون	استخراج الزيت
	النبيذ	لجعله رائقاً
الأنزيمات	عصير-	هدم وفصل المواد البكتينية الموجودة في العصير
البكتينية المتلفة	الحمضيات	
	الفواكة	التليين المفرط Excessive softening
البروتيازات Proteases النافعة	المعجنات	فعل التليين في العجين. يختزل زمن المزج ويزيد من قابيلته المد للعجين.
	اختمار البيرة	نشوء المواد المغذية والنكهة والقوام خلال الاختمار
	الحبوب	تحويل البروتينات لزيادة سرعة التجفيف

الأنزيم	الغذاء	الهدف والفعل
	الجبن	تخثر الكازين Casein
	(البيض، منتجات البيض)	تحسين خواص التجفيف
	السمك واللحوم	جعلها سهلة المضغ. استرداد البروتينات من العظام، تحرير الزيوت
	الحليب	في تحضير حليب فول الصويا
	النبيذ	جعله رائقاً
البروتيازات المتلفة	البيض	تقلل من فترة الخزن
	الطحين	تقلل من حجم الصمون وتؤثر في بنيته أحياناً
الليباز Lipase النافع	الأجبان	خصائص النكهة والنضوج والخزن
	الزيوت	تحويل الشحوم إلى كلسيرول وأحماض دهنية
	الحليب	إنتاج الحليب بنكهة خاصة لإستخدامه في الشيكولا
الليباز الضار	الحبوب	زيادة اسمرار فطيرة الشوفان، اسمرار نخالة القمح
	الحليب ومنتجاته	التزنخ الناتج عن التحلل المائي
	الزيوت	التزنخ الناتج عن التحلل المائي
الفسفاتازات phosphatases	أغذية الأطفال	زيادة الفسفات المنتفع منها
	اختمار البيرة	التحلل المائي لمركبات الفسفات
	الحليب	الكشف عن كفاءة البسترة
النيوكليازات Nucleases	تقوية النكهة	إنتاج النيوكليوتيدات والنيوكليوسيدات
البيروكسيدازات Peroxidases	الخضراوات	الكشف عن جدوى السلق يستخدم مع اوكسداز الكلوكوز Clucose oxidase

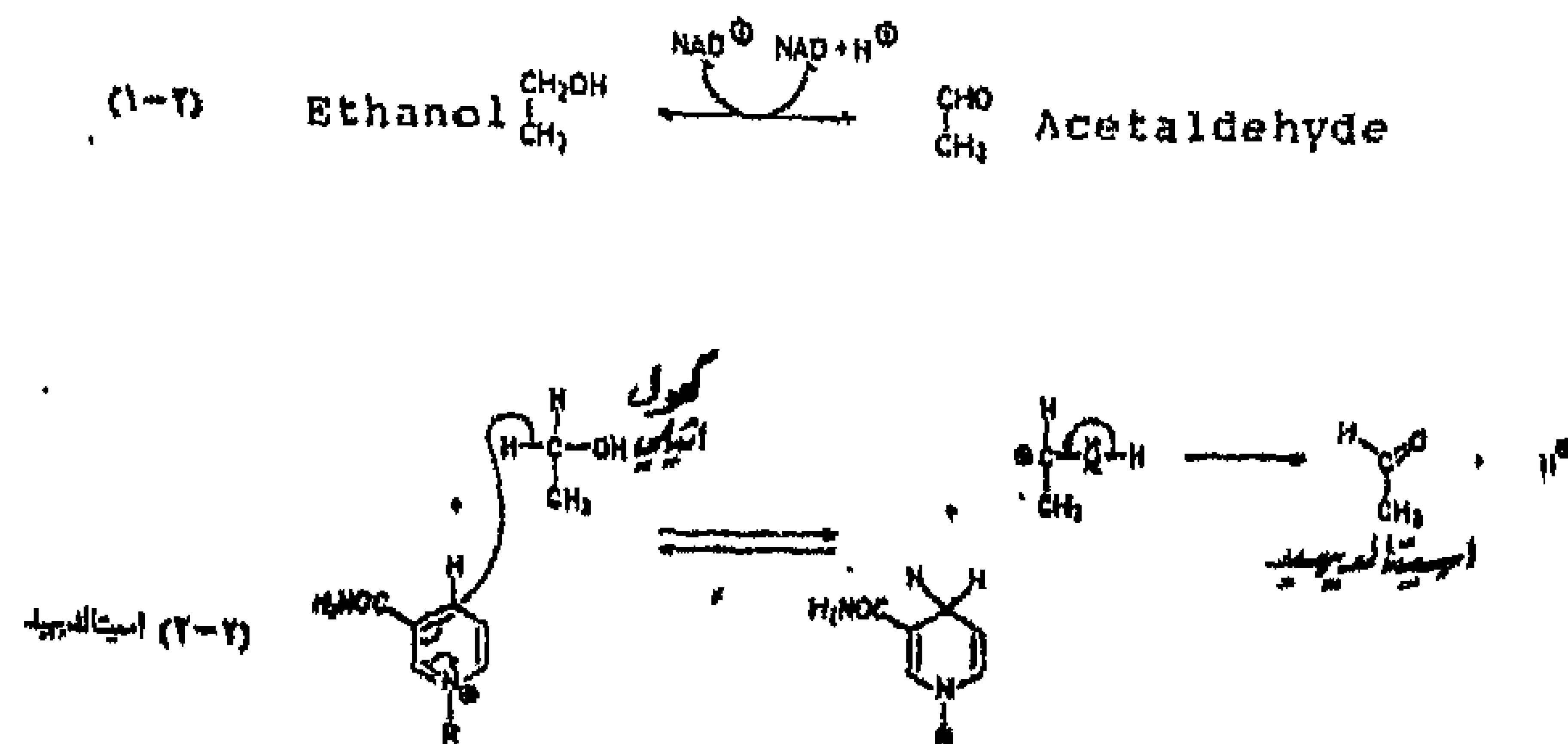
الأنزيم	الغذاء	الهدف والفعل
النافعة		لتقدير الكلوكوز
المتلفة	الخضراوات	تؤدي إلى نكهات غير مرغوبة
	الفواكه	الإسهام في تفاعلات الإسمرار
الكاتالاز	الحليب	إتلاف H_2O_2 بالبسترة الباردة Cold Pasturization
	المنتوجات	لإزالة الكلوكوز أو/والأوكسجين لمنع الاسمرار أو/والأكسدة. يستخدم سوية مع اوكسداز
اوكسداز الكلوكوز Glucose oxidase	المنتوجات المختلفة	الكلوكوز إزالة الأوكسجين أو/ والكلوكوز من المنتوجات مثل البية والجبن، والمشروبات الغازية والبيض المجفف وعصير الفواكه واللحوم والأسماك وبودرة الحليب والنبيذ لمنع الأكسدة أو/ والاسمرار. يستخدم سوية مع الكاتالاز لتعيين الكلوكوز يستخدم سوية مع البيوكسداز
أوكسدازات عديد الفينول النافعة Polyphenol oxidases	الشاي، القهوة التبغ	لنشوء الاسمرار خلال النضوج للإختمار أو/ وعملية التعتيق
أوكسدازات عديد الفينول المتلفة	الفواكه، الخضراوات	الاسمرار، نشوء نكهة غير مرغوبة، الفيتامينات
الأنزيم المؤكسج للشحوم Lipoxygenase	الخضراوات	تلف الأحماض الدهنية الجوهرية وفتيامين A ونشوء نكهات غير مرغوبة.

الأنزيم	الغذاء	الهدف والفعل
اوكسسداز حسامض الاسكوربك	الخضراوات، الفواكه	إتلاف فيتامين C(حامض الإسكوربيك)
Thiaminase	السمك، اللحوم	إتلاف الثيامين

6-2 أنزيمات الأكسدة المرجعة Oxidoreductase

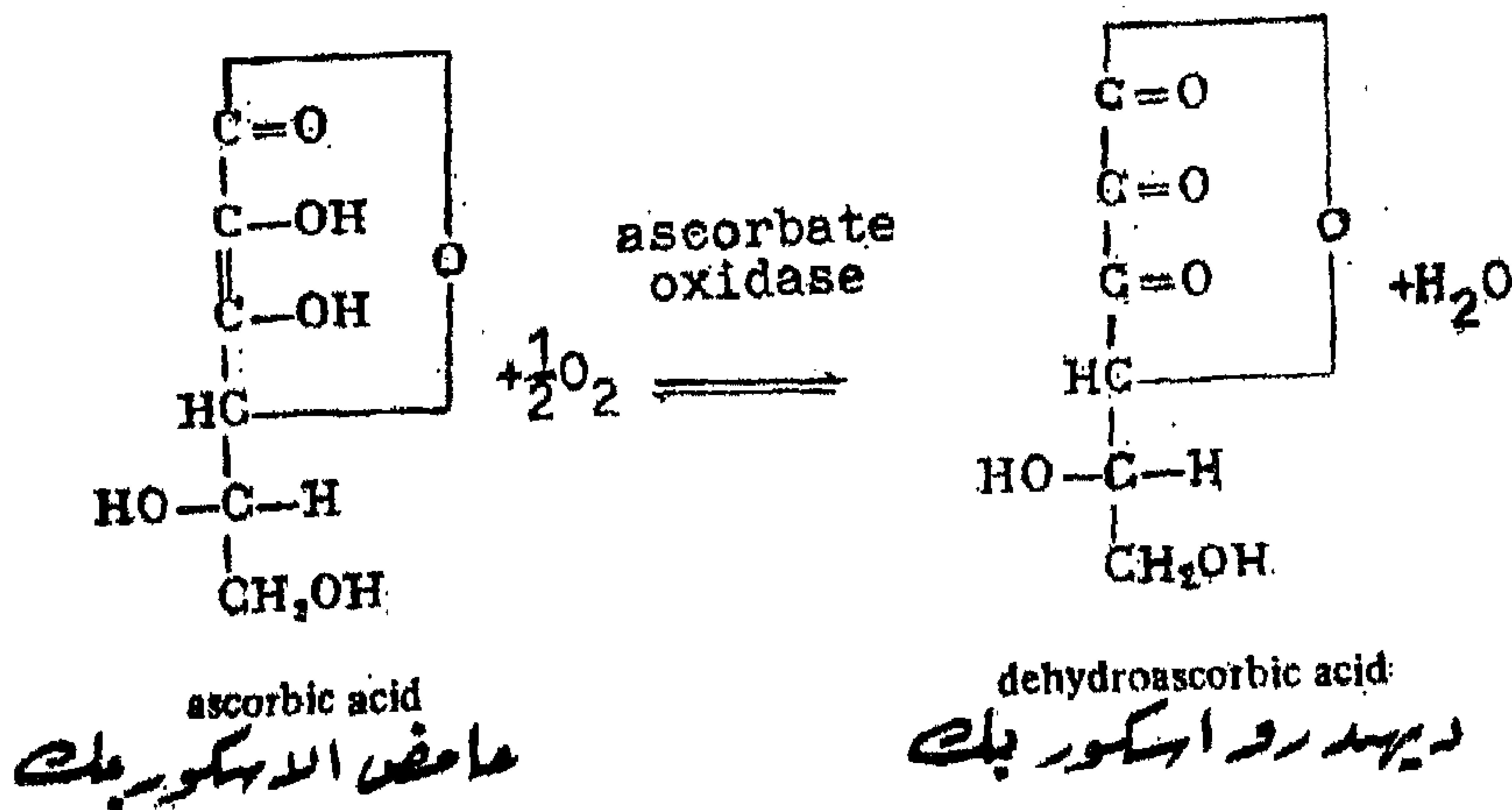
تشمل أنزيمات الأكسدة المرجعة جميع الأنزيمات المحفزة لتفاعلات الأكسدة والاختزال مثل الأنزيمات النازعة للهيدروجين Dehydrogenases والأنزيمات المسماة Oxidases و Oxygenasesو Oxygenases و peroxidases وهذه بأجمعها أسماء شائعة لمجاميع أنزيمية تنتمي إلى الصنف أعلاه وهو الصنف الأول ضمن التصنيف النظامي.

تقوم نازعات الهيدروجين بتحفيز تفاعلات الأكسدة والاختزال وذلك لإن فقدان مركب لذرات الهيدروجين (أو ما يسمى مكافئات الإختزال Reducing eqvivalents يعني أكسدته نظراً لاحتواء ذرة الهيدروجين على الكترون ومن ثم فقدان ذرة هيدروجين يعني فقدان الكترون وعلى العكس فإن اكتساب مركب لذرة هدروجين يعني اكتساب الكترون وبالتالي اختزاله، ويمكن توضيح ما تقدم بالتفاعل المحفز بالأنزيم dehydrogenase Alcohol



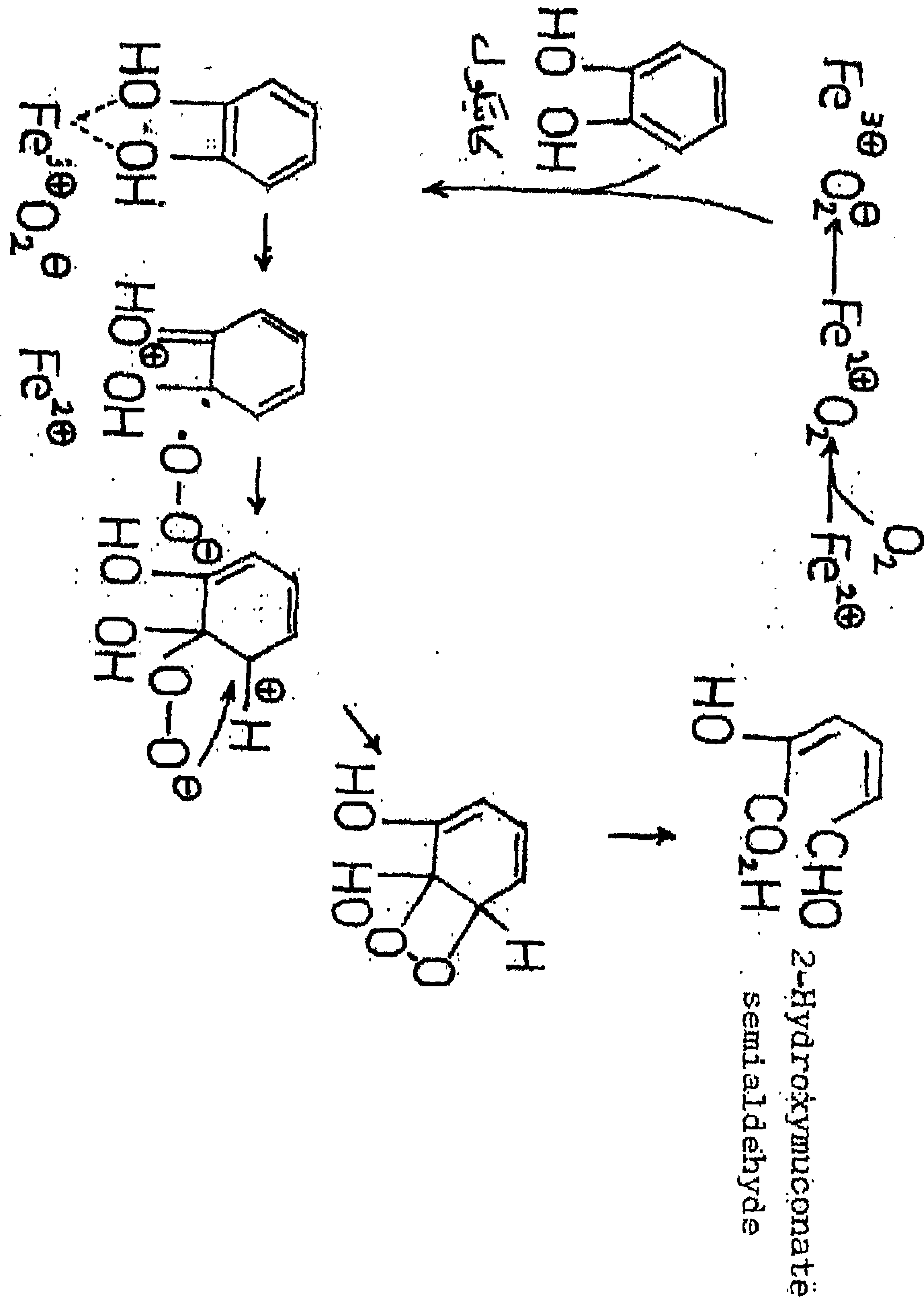
ملاحظة: تمثل R ما تبقى من الجزيئة (انظر الشكل 1-7)

تحفز أنزيمات الاوكسداز Oxidases نقل الإلكترونات أو ذرات الهيدروجين من الركيزة إلى الأوكسجين الذي يختزل بدوره إلى ماء أو بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 كمثال الأنزيم Ascorbate oxidase الذي يوكسد حامض الإسكوربك منزوع الهدروجين Dehydroascorbic acid مع تكوين جزيئة ماء.



تستخدم الأنزيمات المسماة Oxygenases الأوكسجين الجزيئي في التفاعلات التي تحفزها وتنقل إحدى ذرتيه أو كليهما إلى الناتج. يوضح الشكل (2-5) الآلية المقترحة للتفاعل المحفز بالأنزيم Catechol 2.3- oxygenase الذي يحول الركيزة Catechol إلى 2– Hydroxymuconate semialdehyde يحتوي الأنزيم على أيون الحديدوز في الموقع النشط، وعند ارتباطه بالأوكسجين الجزيئي يتأكسد إلى حديديك مع تكوين جذر الأوكسجين (O_2^-). يهاجم المعقد الأنزيمي الناتج ($Enz\text{-} Fe^{3+} O_2^-$) مركب ال Catechol مؤدياً إلى انفتاح الحلقة وإدخال ذرتي أوكسجين لتكوين الناتج.

سوف نتناول فيما يأتي شيء من التفصيل بعض أنزيمات الأكسدة المرجعة وأهميتها التطبيقية.



شكل 2- 5 تحول المركب Catechol إلى 2-Hydroxymuconate Semialdehyde بفعل الأنزيم Catechol 2.3- oxygenase أيونات الحديدوز المرتبطة بالانزيم في عملية التحفيز

2-6-1 O- Diphenol Oxidase وتفاعلات الإسمرار Browning reactions في الأغذية.

يحدث هذا النوع من الإسمرار الأنزيمي على سطح بعض ثمار الفواكه والخضراوات كالتفاح والموز والبطاطا والفطر عند تلف أو خدش أو تقشير أو تعريض الأنسجة إلى ظروف غير طبيعية. تتلون الأنسجة المخدشة بلون داكن عند تعرضها لأوكسجين الهواء الجوي وذلك لتحول المركبات الفينولية إلى صبغة بنية اللون تسمى Melanin ويدعى الأنزيم المسؤول عن بدء تفاعلات الإسمرار هذه بالإسم الشائع O-Diphenol oxidase ويعطى التسمية النظامية التالية:

O-diphenol oxygen oxidoreductase, Ec 1.10.3.1

وهناك تسميات شائعة أخرى له وهي Tyrosinase وCatecholase و Phenolase. يؤدي هذا الأنزيم إلى أكسدة الفينولات الأحادية Monophenols كالتيروسين Tyrosine والفينول وp- cresol و3.-4 Dimethylphenol. ويمكن أكسدة عدد من المركبات اورثو- ثنائية الفينول O.Diphenol وكمثال catechol وثلاثيتها Triphenols مثل pyrogallol بفعل أنزيمات الPhenolase هذه كما في الجدول (2-2).

ويمكن تقسيم التفاعلات التي تحفزها الأنزيمات التي تنتمي إلى مجموعة الفينولاز Phenolase إلى قسمين:

أ- Phenolase hydroxylase أو ما يسمى Cresolase activity

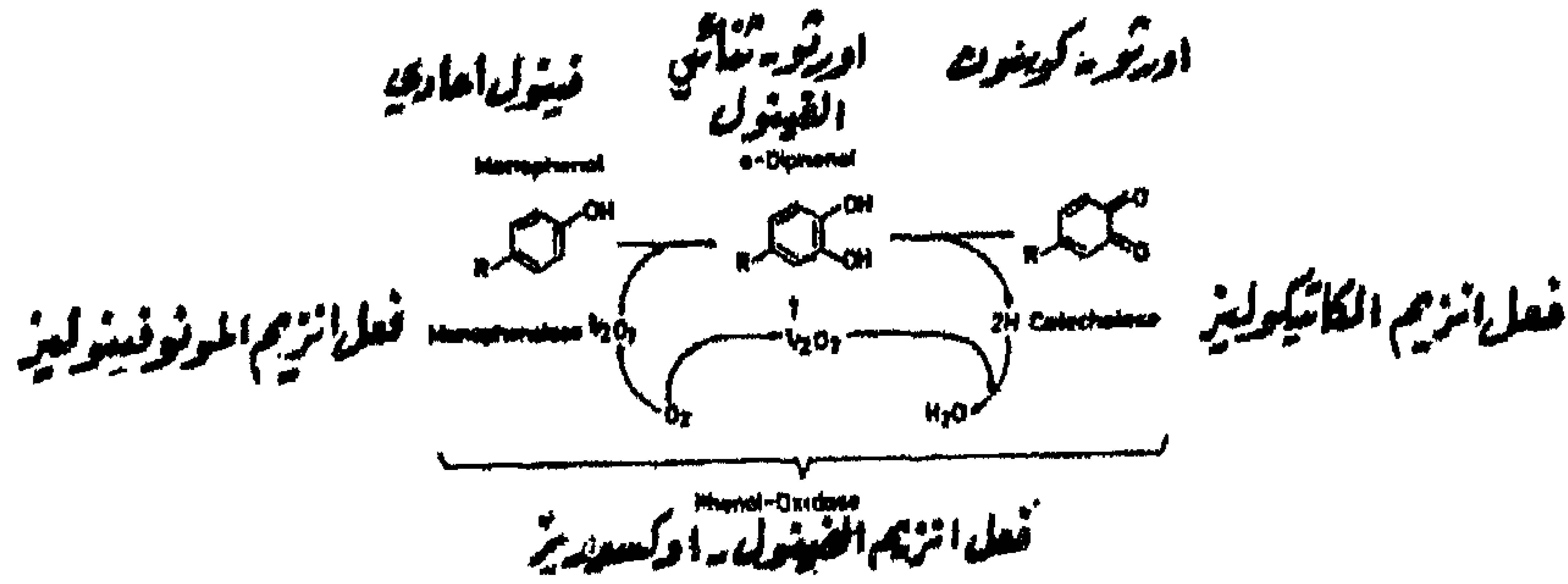
ب- تفاعلات polyphenol oxidase أو ما يسمى Catecholase activity.

فعند أكسدة الفينولات الأحادية يكون للأنزيم تأثير ثنائي في هذه المركبات (شكل 2-6) فهو يحفز إدخال ذرة أوكسجين في الركيزة ويحولها إلى O-Diphenol وهذا ما يسمى MonoPhenolase effect ثم يعمل على سحب ذرتي هدروجين من الناتج O-Diphenol وينقلهما إلى الأوكسجين لتكوين جزيئة ماء ويسمى التأثير الأخير (Catecholase effect) وينتج عنه اورثو-كوينون

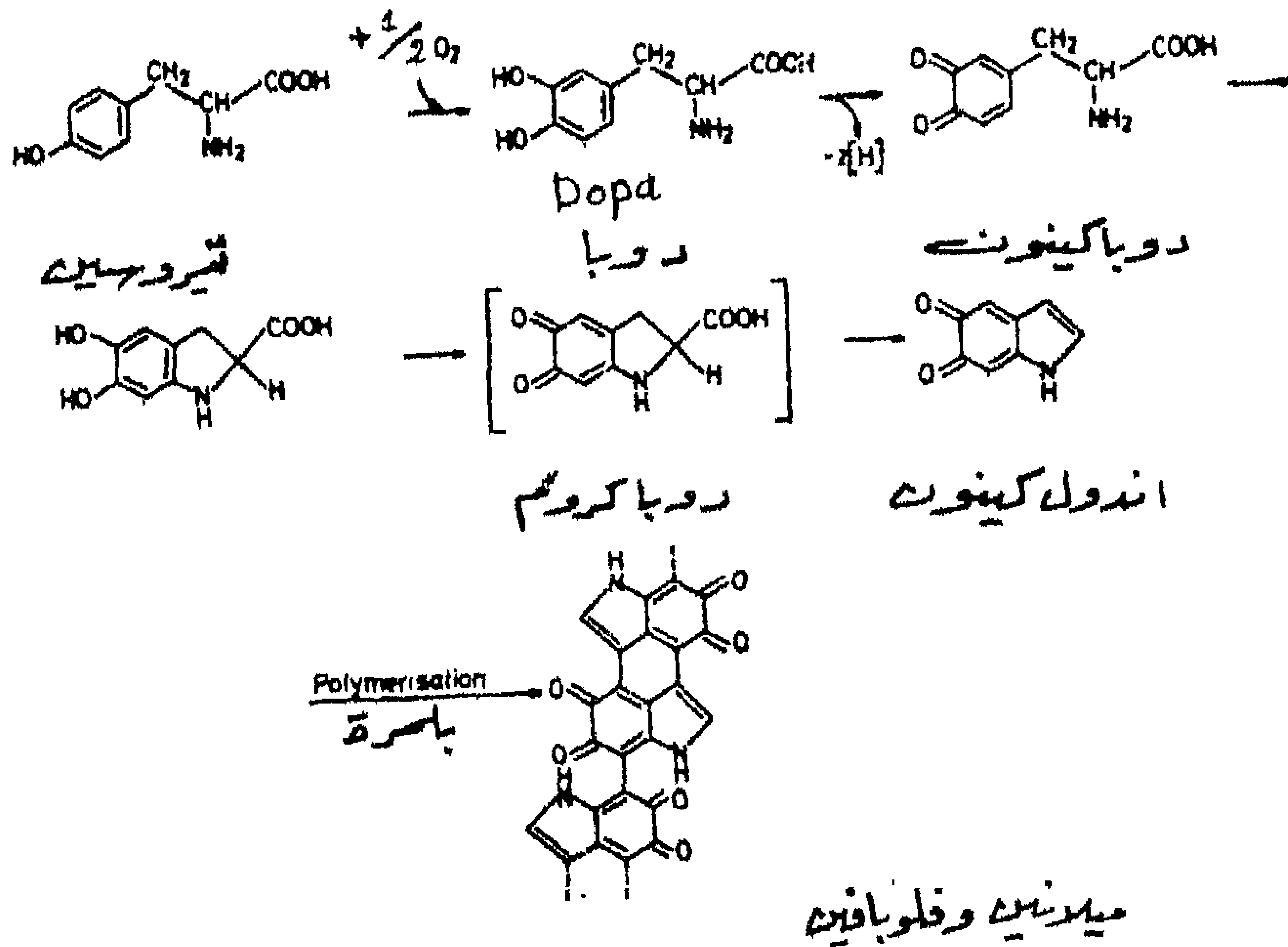
O. Quinone تنتج تفاعلات الإسمرار عن هذه الفعاليات الأنزيمية كما في الشكل (2-7) الذي يوضح تأثير أنزيمات ال Phenolase في الحامض الأميني تيروسين.

جدول 2-2 الركائز المختلفة للأنزيم O-Diphenol oxidase والسرعات النسبية لأكسدتها.

الركيزة Substrate	التركيب الكيميائي	السرعة النسبية(٪) لأكسدتها
Chorogenic acid		10
Catechol		50
Pyrogallo		35
Caffeic acid		31
3.4- Dihydroxy phenyl- alanine (Dopa)		20
P- Cresol		12
Tyrosine		5
Tyrosine-ethylester	-	4
Rutin (flavono glycoside)		4
p- Cinnamic acid		2



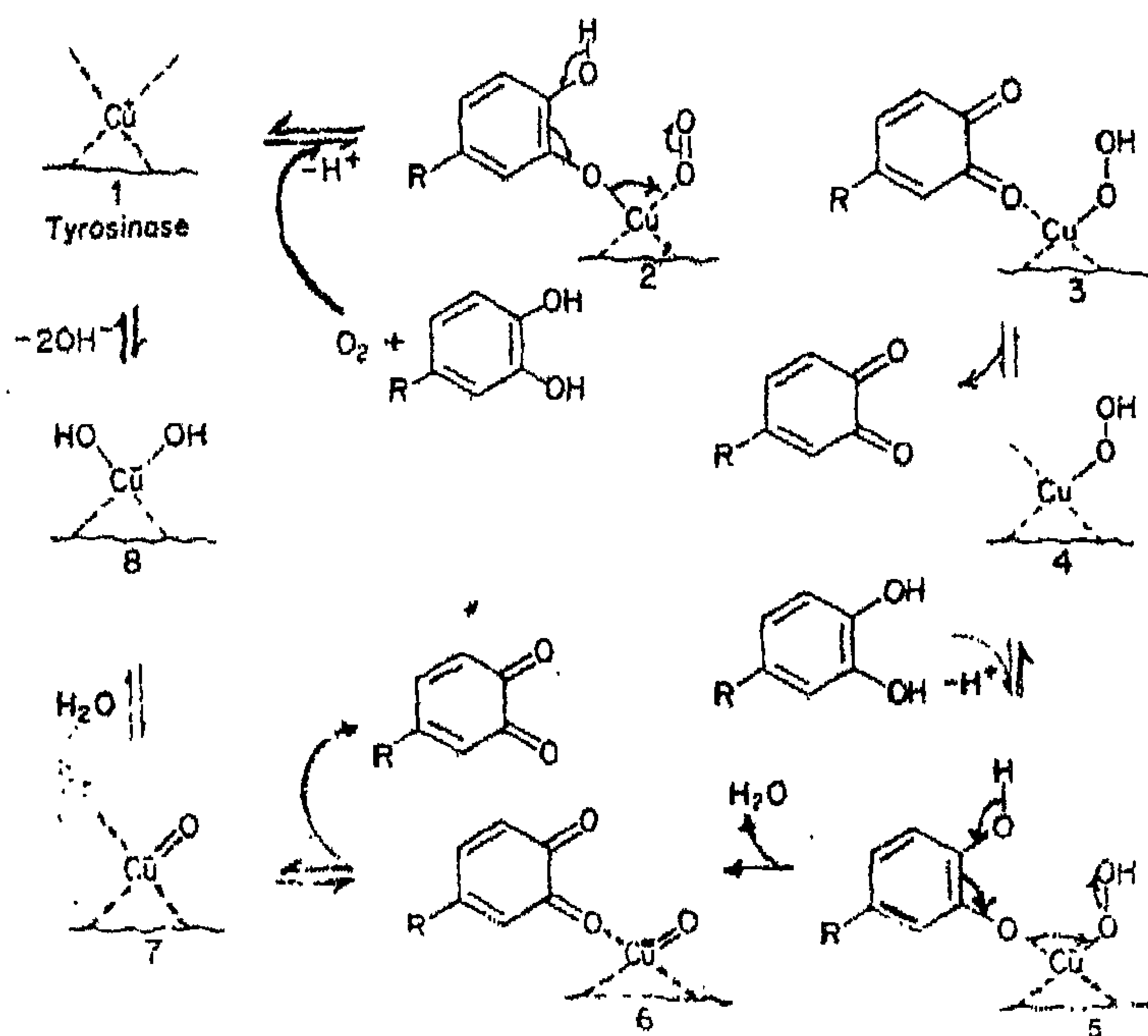
شكل 2- 6 الفعاليتان التحفيزيتين MonoPhenolase وCatecholase للأنزيمات (Phenolase) O- Diphenol oxidase



شكل 2- 7 تكوين الميلانين بني اللون من الحامض الأميني تيروسين نتيجة لفعل أنزيمات الفينولاز (O- Diphenol oxidase) Phenolase

يتضح من الشكل تكوين المركب ميلانين Melanine وphlobaphene نتيجة لبلمرة Polydmerization جزيئات الاورثومكونيون المسمى Indilquinone.

يحتوي البحوث إلى وجود النحاس بصيغة أيون النحاسوز (Cu^{+}) كما في الأنزيم MonoPhenolase أو بشكل نحاسيك (Cu^{++}) كما في الأنزيم Catecholase علما بأن كلا الفعالتين التحفيزيتين تعود لتركيب بروتيني واحد. يوضح الشكل (2-8) الآلية المقترحة لأكسدة مركبات O-Diphenol بواسطة الأنزيم polyphenol oxidase إلى اورثو-كوينون O-Quinone ونظراً لوجود أيون النحاس في الموقع النشط، فإن من الممكن إضافة مواد تشكل معقدات معه Metal Complexing agents مثل فلوريد الصوديوم NaF وازيد الصوديوم (NaN_3) وبذلك تثبط الفعالية التحفيزية.



شكل 2- 8 الآلية المقترحة لأكسدة مركبات O- Diphenol بواسطة الأنزيم Polyphenol oxidse

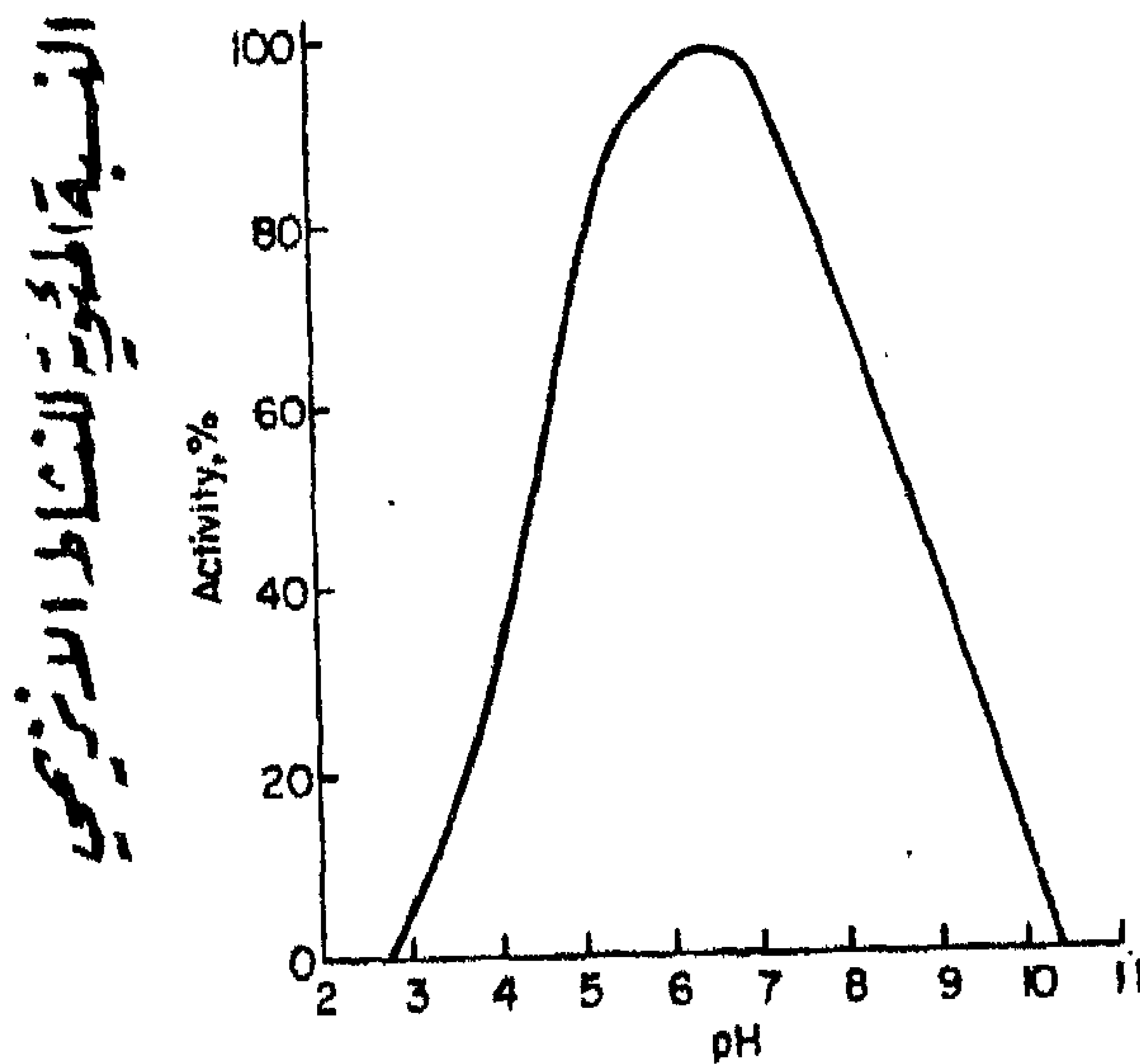
2-6-1-1 السيطرة على تفاعلات الإسمرار

تشكل تفاعلات الإسمرار مشكلة كبيرة في تكنولوجيا الغذاء ولمنع حدوثها والسيطرة على ظاهرة الإسمرار غير المرغوبة يمكن اتباع إحدى الطرق الآتية :-

1- إضافة الحوامض :

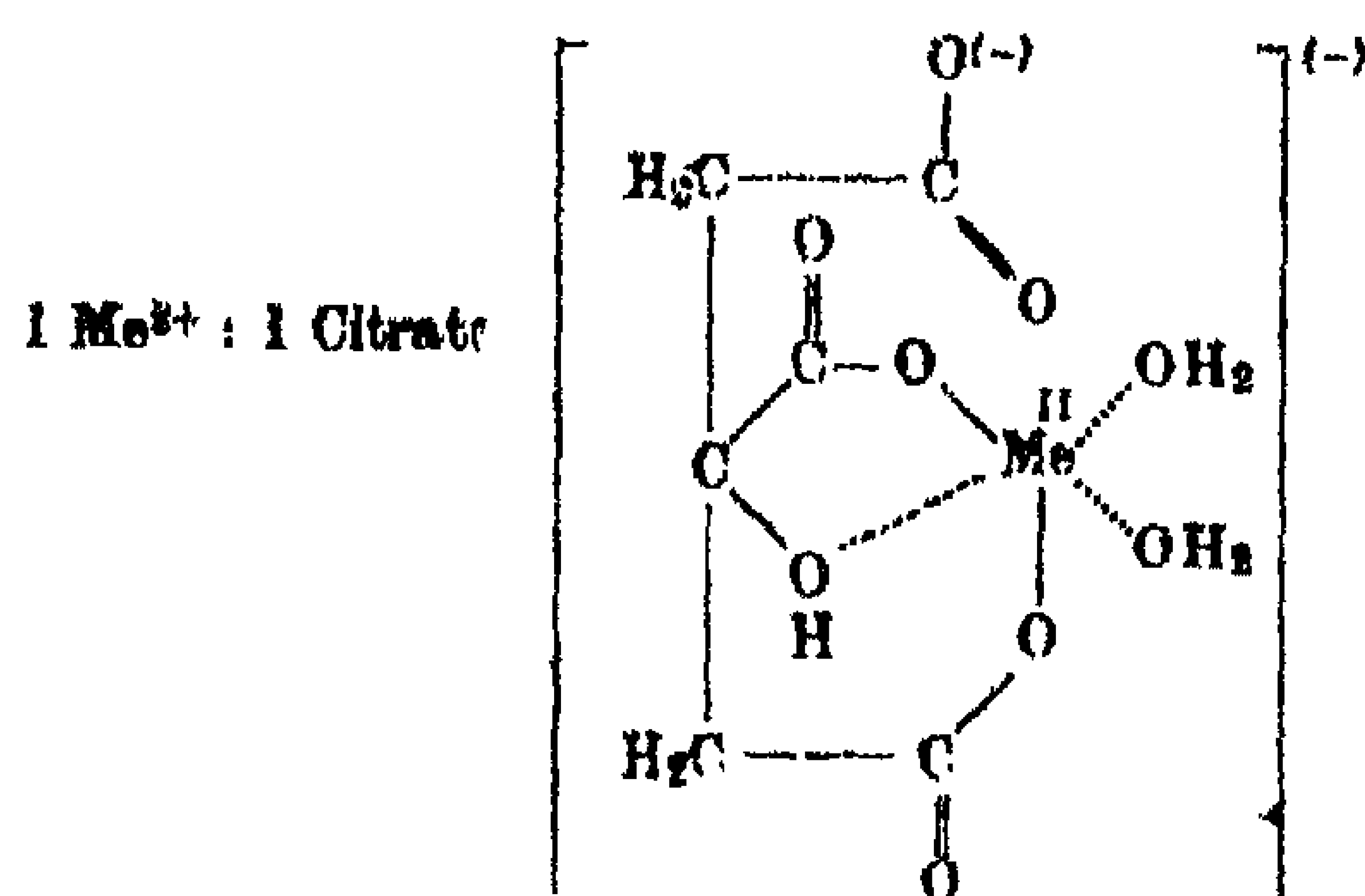
تستعمل هذه الطريقة بكثرة للسيطرة على تفاعلات الإسمرار وتستخدم لهذا الغرض الحوامض الموجودة بصورة طبيعية في الأنسجة وخاصة حامض الستركِ وحامض المالك وحامض الفسفورك وحامض الإسكوربك. ويكون تأثير هذه الحوامض بصورة عامة خفض الرقم الهدروجيني (pH) للأنسجة ومن ثم إبطاء سرعة تفاعلات الإسمرار.

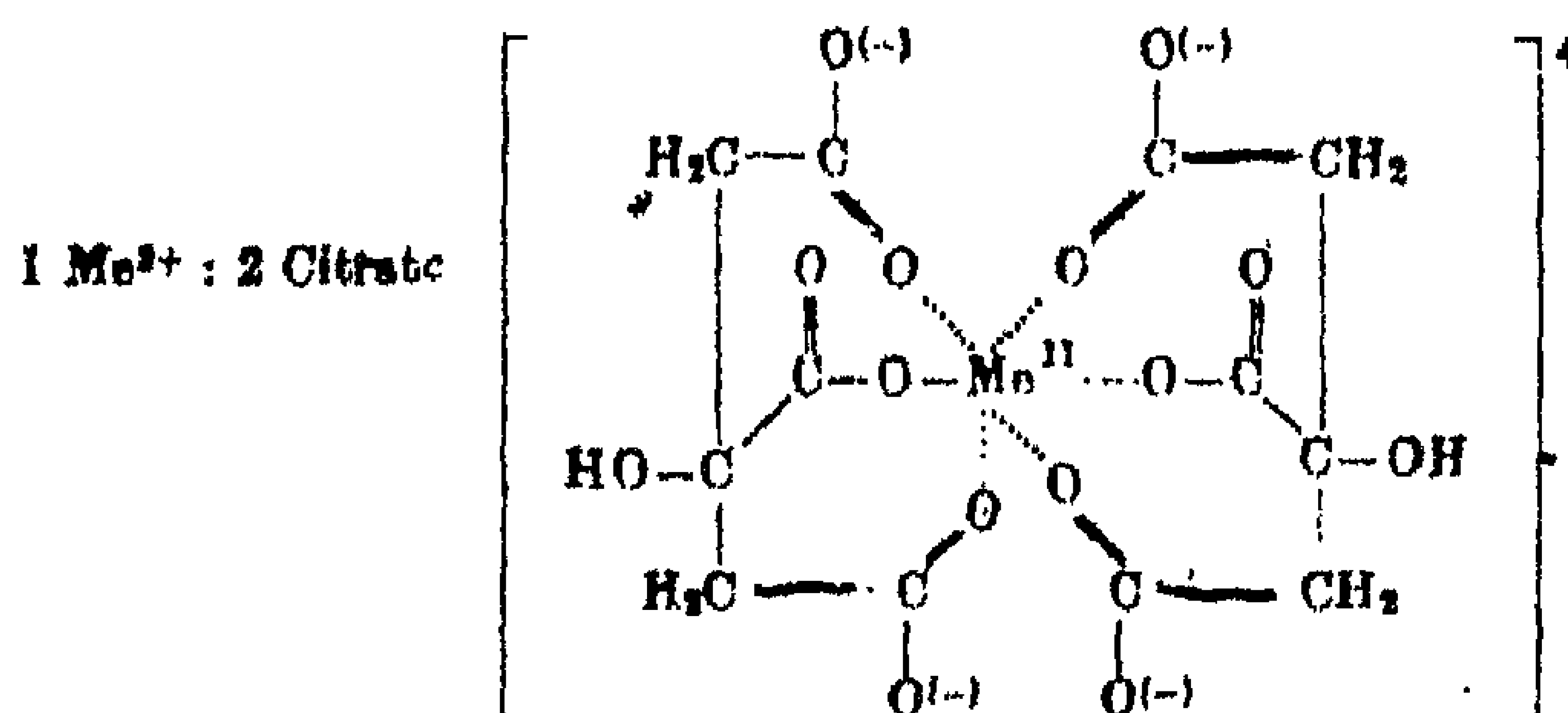
يوضح الشكل (2-9) بأن الرقم الهدروجيني الأمثل للفعالية الأنزيمية يتراوح بين 6 و7 في حين يفقد الأنزيم نشاطه في PH أقل من 3.



شكل (2-9) تأثير الرقم الهيدروجيني (pH) في نشاط الانزيم Phenolase

إن لحامض الستريك تأثيراً ثنائياً في أنزيم الفينولاز Phenolase، فهو إضافة إلى تأثيره الحامضي، يعمل على تكوين خلابه chelating agent مع أيون النحاس الموجود في الموقع النشط للأنزيم. إن تركيب المعقد الناتج Metal-citrate complex غير معروف تماماً إذ يعتمد إضافة إلى تكافؤ الأيون على ظروف التفاعل مثل التركيز وجردة الحرارة والرقم الهيدروجيني ونسبة السترات إلى الأيون. يرتبط أيون النحاسيك في المعقد مع السترات من خلال مجموعتي الكريوكسيل بغض النظر عن نسبة الأيون إلى السترات وسواء كانت 1:1 أو 1:2 أو3:1. يمكن توضيح الترتيب الفراغي لأيون النحاسيك في المعقدات من هذا النوع في محيط حامضي ضعيف في الشكل (2-10) وهذه صورة مبسطة لا تأخذ بعين الإعتبار جزئيات الماء الداخلة في التركيب المعقد.



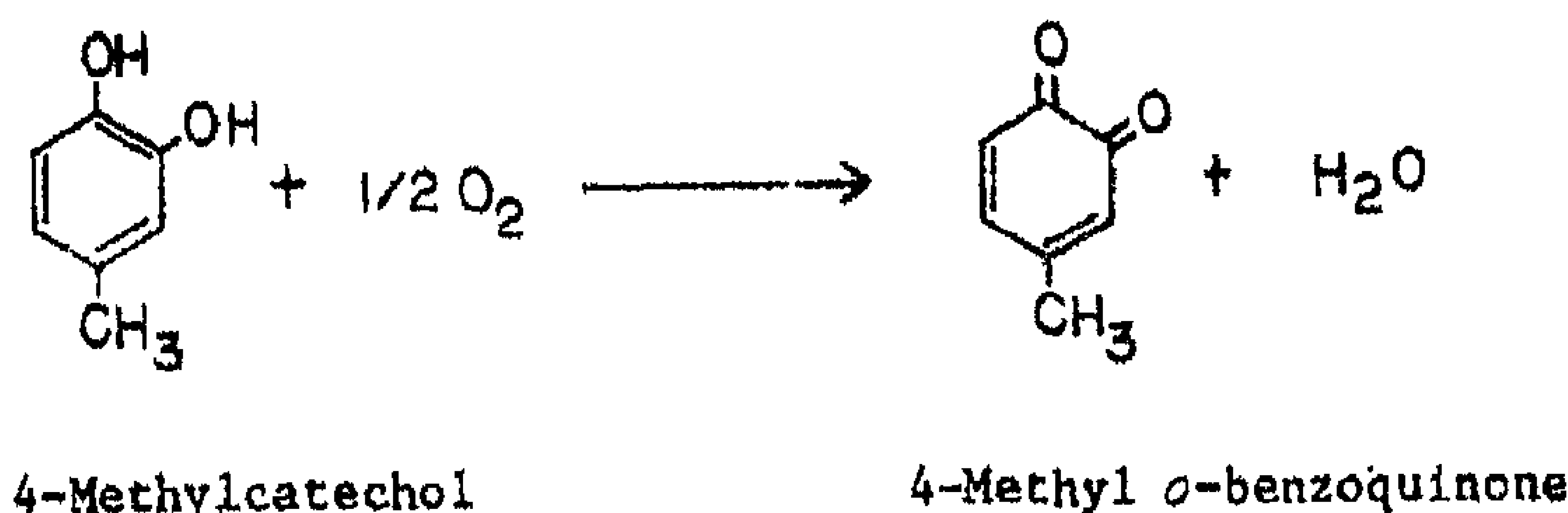


شكل 2- 10 المعقدات المتكونة بين النحاس - الموجود في الموقع النشط لإنزيم الـ Phenolase - وحامض الستريك

تجدر الإشارة إلى أن حامض المالك- الذي يعد الحامض الأساس في عصير التفاح- أكثر كفاءة في تثبيط أنزيم ال Phenolase من حامض الستريك الموجود في عصير التفاح أيضاً.

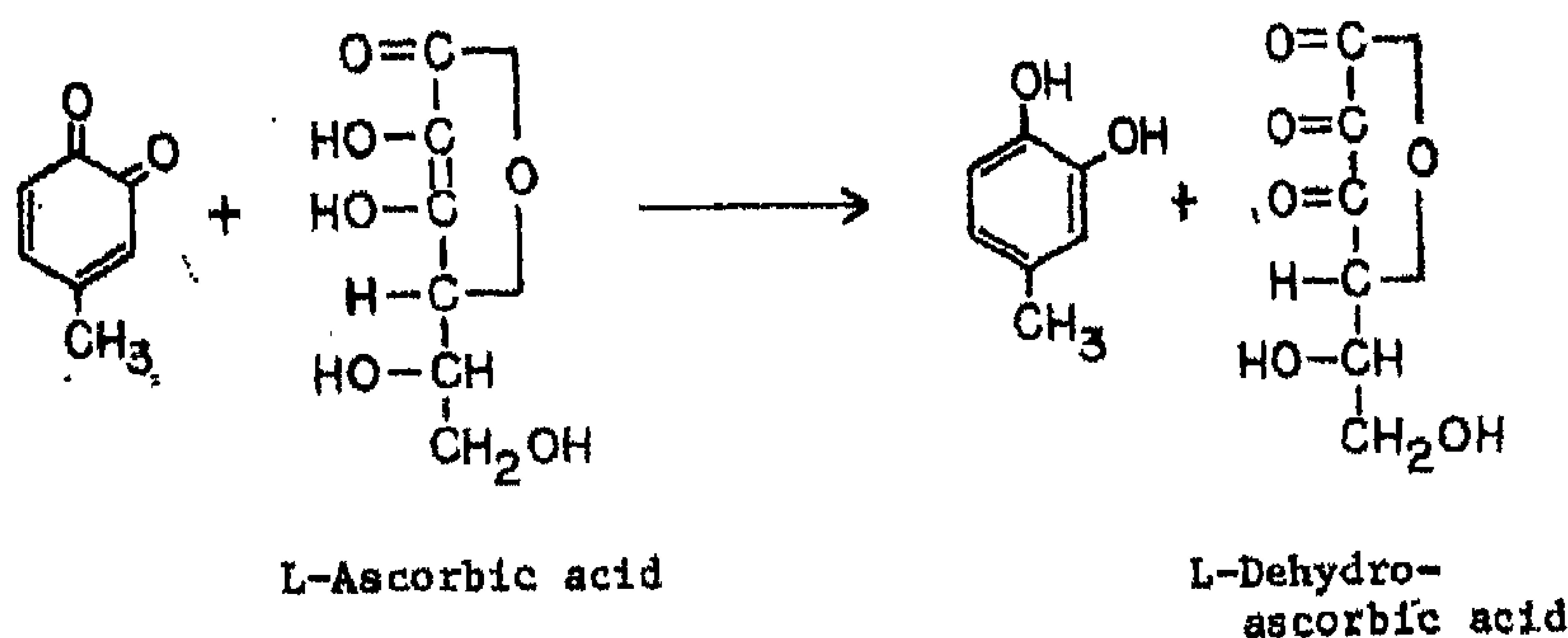
يتفوق حامض الإسكوربك في تأثيره التثبيطي في حامضي الستريك والمالك وبذلك يستخدم لمنع تفاعلات الإسمرار الأنزيمية ويمكن توضيح تأثيره في أنزيم الPhenolase بالمعادلتين الآتيتين:

أ- يبتدىء تفاعل الإسمرار بتأثير الأوكسجين الجزيئي 4-Methyl catechol ويحوله إلى 4-Methyl o- benzoquinone



(4 -2)

ب- يؤدي حامض الإسكوربك إلى إعادة اختزال الناتج وتكوين المركب الأصلي 4-Methyl catechol.

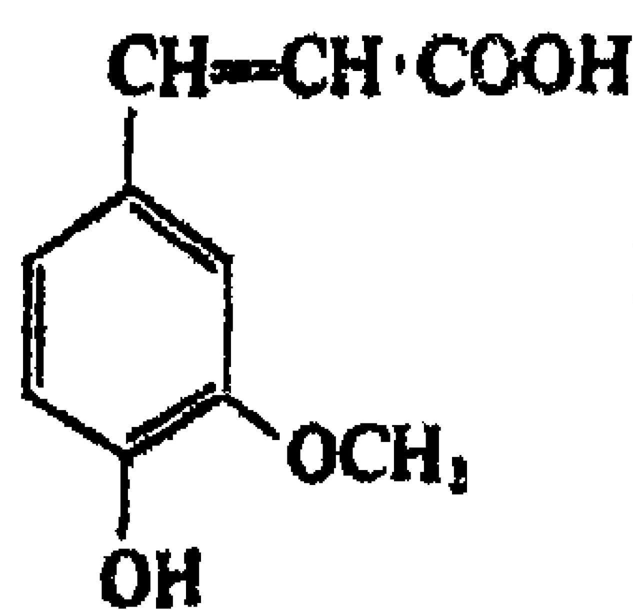


إضافة إلى ما تقدم يمتلك حامض الإسكوربيك خواصاً أخرى مفيدة فهو لا يؤثر على نهكة المادة الغذائية المصنعة بالتراكيز المستخدمة لهذا الغرض كما أنه لا يؤدي إلى تآكل المعادن not corrosive إضافة إلى قيمته الغذائية بوصفه مقوياً.

لقد وجد بأن إضافة حامض الإسكوربيك بتركيز 660 ملغم لكل كلغم من الفاكهة، تؤدي إلى السيطرة على تفاعلات الإسمرار وتقلل من الأوكسجين الموجود في الفراغ العلوي لعلب التفاح المقطع نصفياً. إن هذه الطريقة المستخدمة للسيطرة على تفاعلات الإسمرار الأنزيمية كثيرة الفائدة نظراً لثخن نسيج التفاح ومحتواه العالي نسبياً من الأوكسيجن.

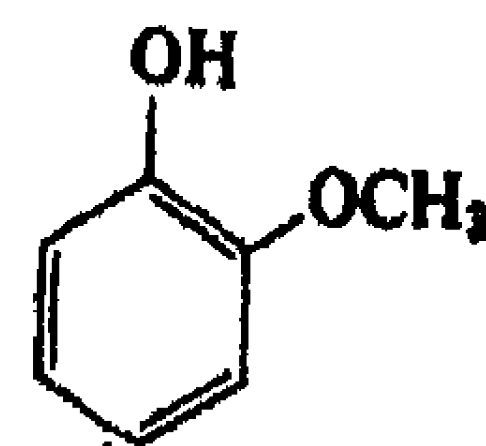
2. مثيلة ركائز أنزيم الفينولاز Phenolase

بالإمكان منع حدوث تفاعلات الإسمرار وذلك بتغيير تركيب الركيزة O-Diphenol لأنزيم ال Phenolase بحيث لا يستطيع الأنزيم أن يعمل عليها وهكذا لا يعد المركبان Guaicol و Ferulic ركيزتين للأنزيم بسبب مثيلتهما Methylation.



Freulic acid

حامض الفريولك



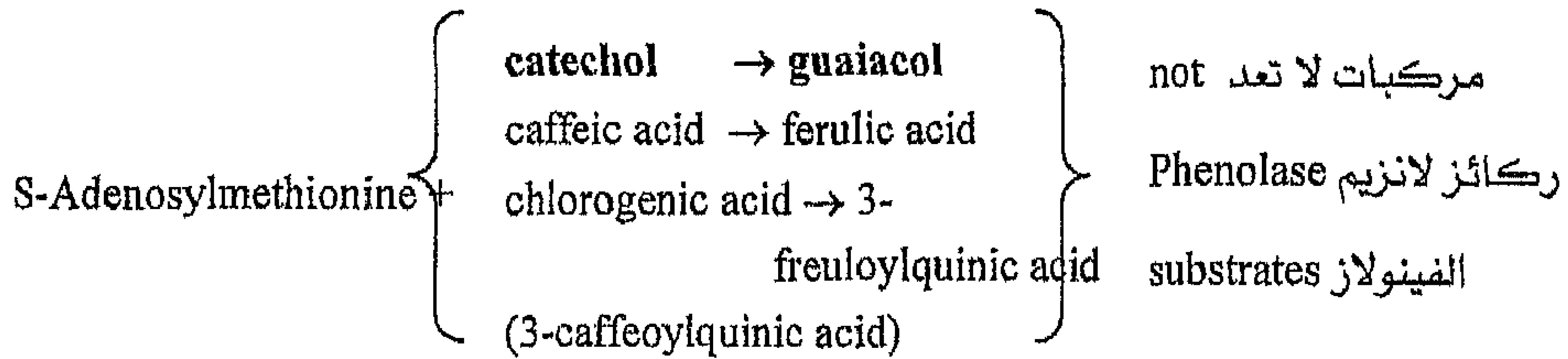
Guiaicol

كوياكول

(5 -2)

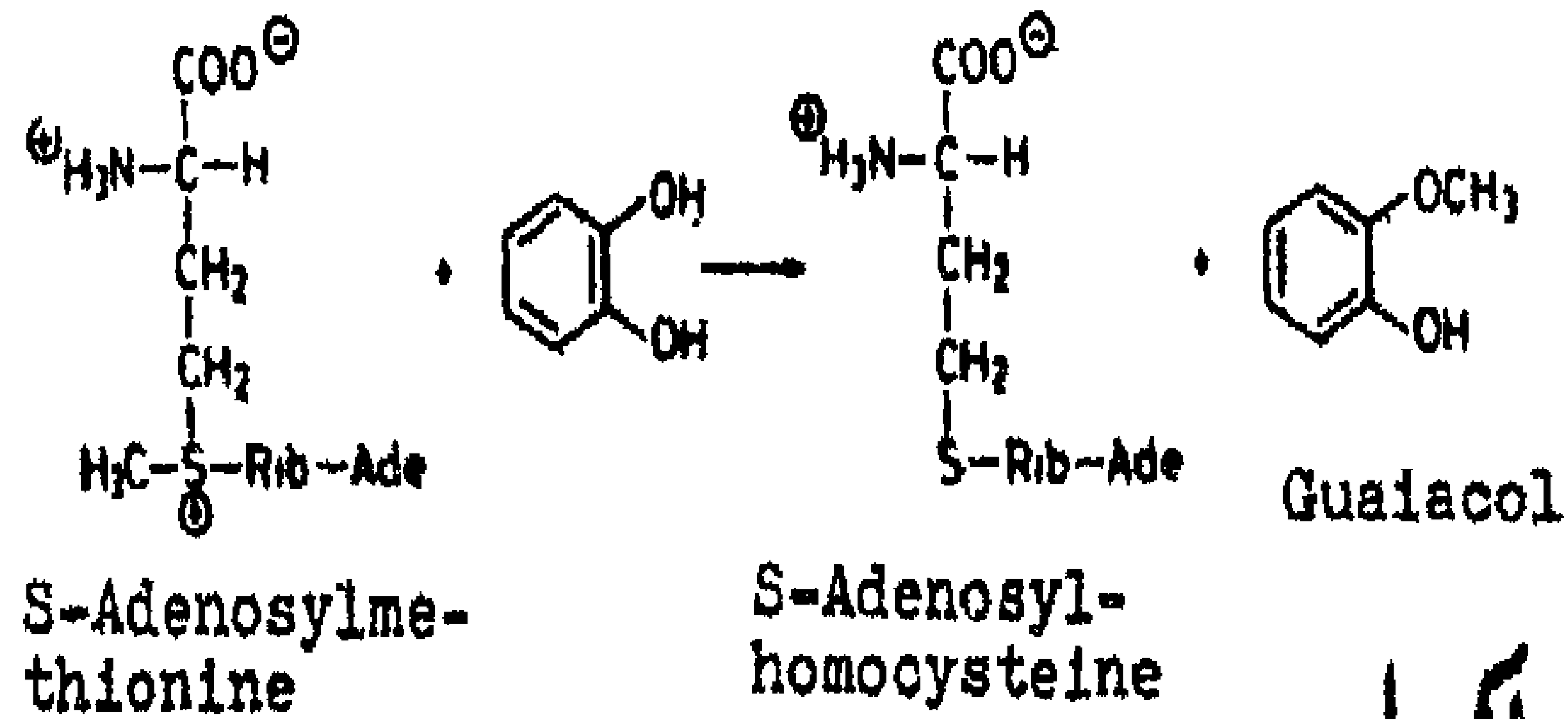
وهكذا يمكن منع تفاعلات الإسمرار الأنزيمي في الثمار والخضراوات بمثيلة ركائز الأنزيم Phenolase. تحتوي أنسجة النباتات مثل pampas grass على

الأنـزيم Catechol Methyltransferase الـذي يـشترك في تخليـق اللكـنين Lignin ومركبات أروماتية أخرى. يعمل هذا الأنزيم بوجود مركب مانح لمجموعة المثيل مثل S-adenosyl methionine وآخر مستقبل لها مثل O-Diphenol:



(6 -2)

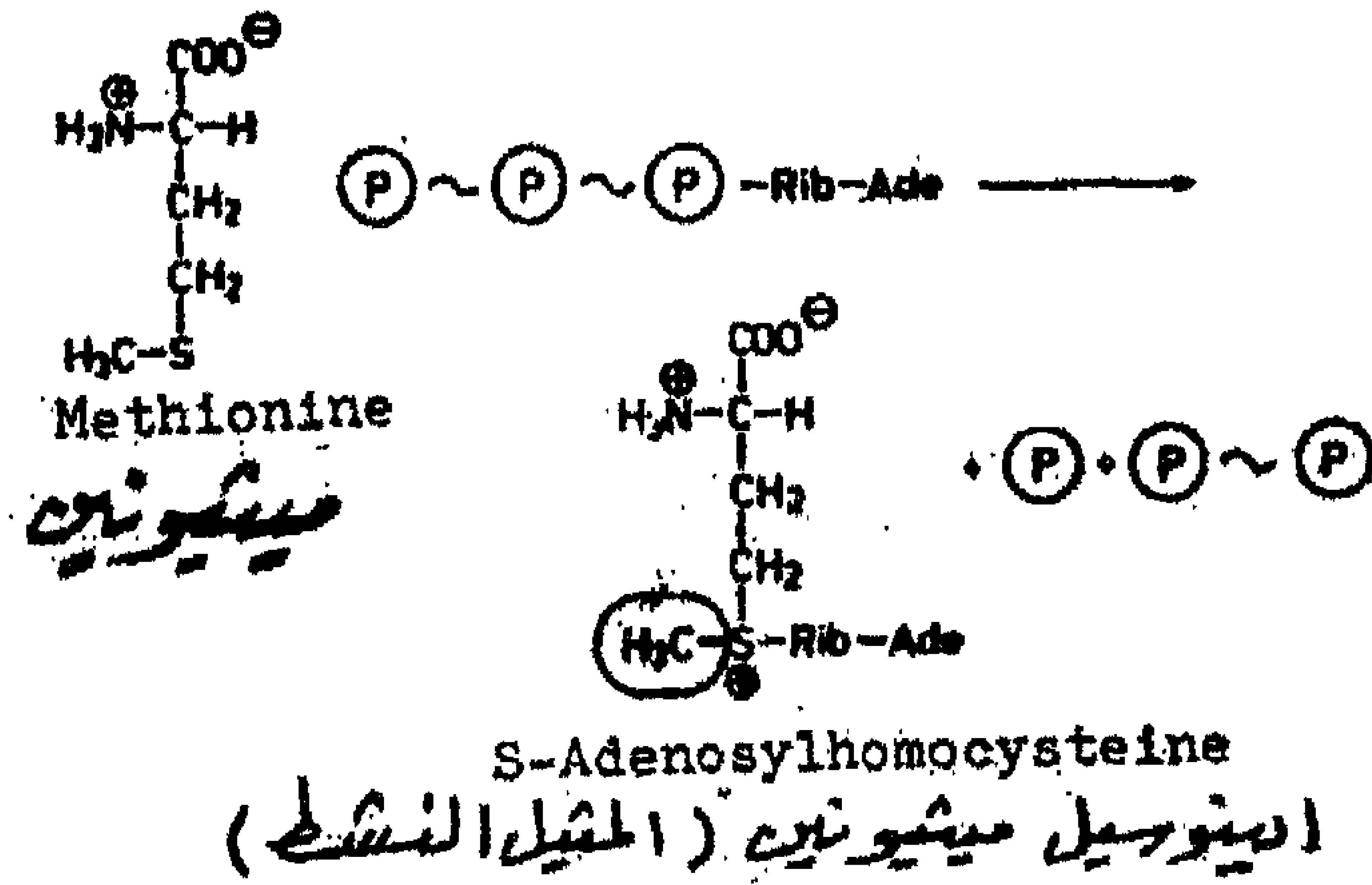
ويمكن توضيح التفاعل الأنزيمي كما يلي :



ادينوسيل مثيونين (المثيل النشط) كاتيكول كوياكول

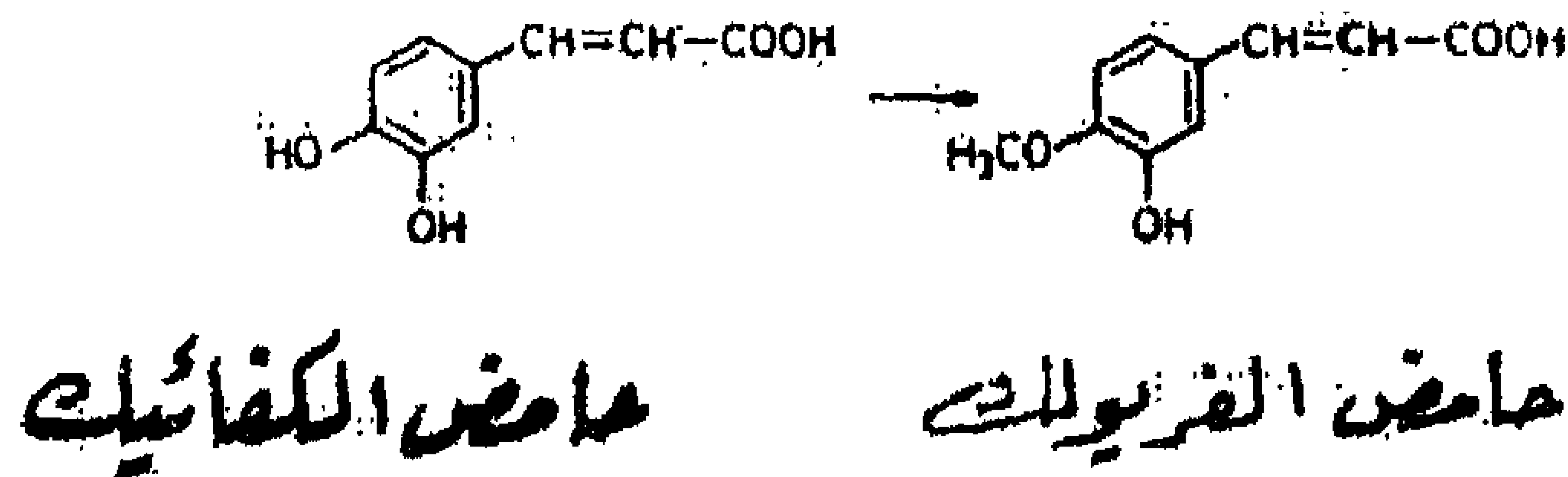
(7-2) ....

يمكـن الحـصول علـى المركـب S-Adenosylmethionine ذي مجموعـة "المثيـل الفعالـة "Active methyl" وذلـك لتثبـيط الحـامض الامـيني ميثيـونين Methionine عند تفاعله مع المركب ATP وكما يأتي :

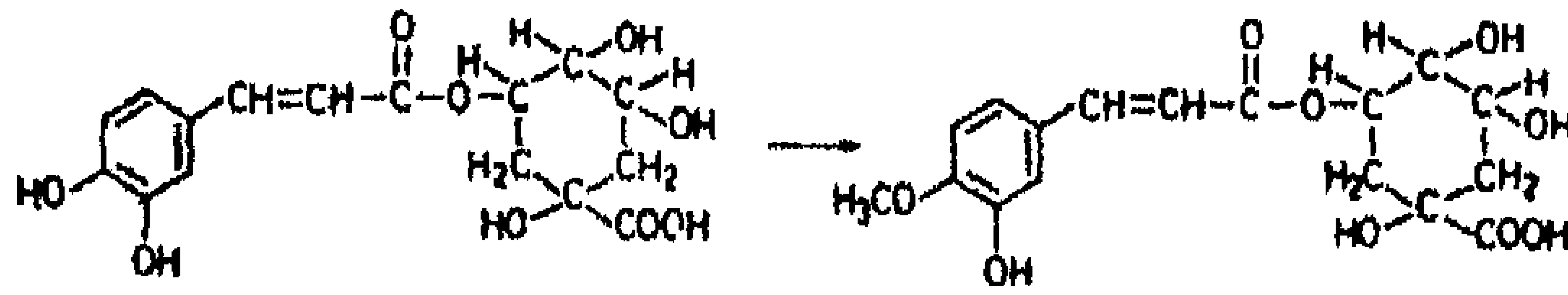


(8-2)

ويتم مثيلة مشتقات المركب Catechol بوجود S-Adenosylmethionine والأنزيم Catechol methyltransferase لتغير تركيبها بحيث لا تصلح ركائز الأنزيم phonolase ، ومن هذه المشتقات chlorogenic acid وCaffeic acid كما في المعادلتين الآتيتين:



(9-2) ....



حامض الكلوروجينيك 3-Feruloylquinic acid

(10-2) ...

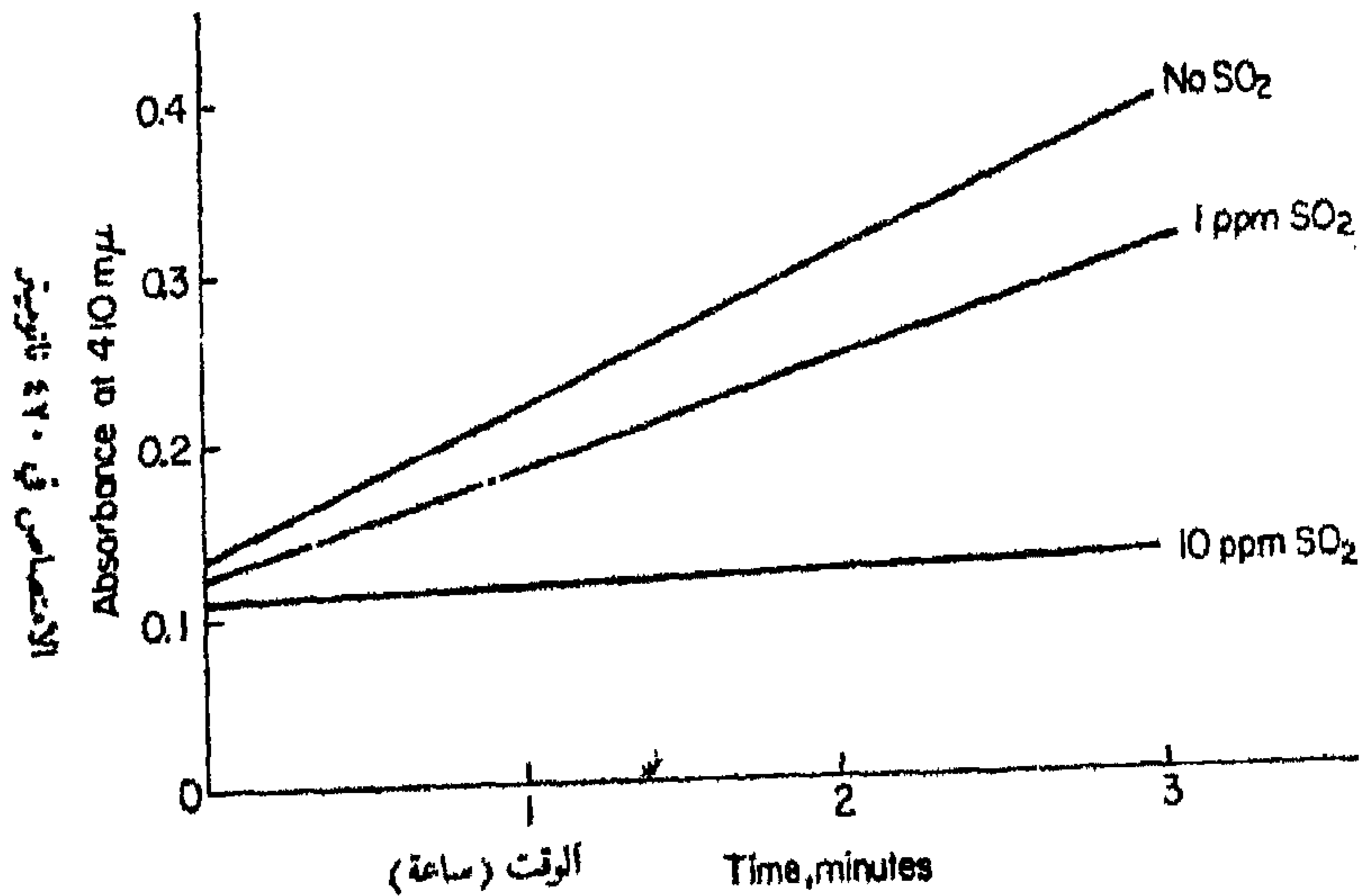
يحتاج الأنزيم Catechol methyltransferase إلى أيون المغنيسيوم بمثابة تميم العامل cofactor ويوجد في أنسجة أشجار الـCambial وفي العشب المسمى Panpas grass إلا أن هذه المصادر غير ملائمة للاستغلال في التصنيع الغذائي وهناك محاولات للحصول عليه من الأحياء المجهرية .

3. استعمال ثاني أوكسيد الكبريت SO_2 والكبريتيت Sulfite :يستعمل في تصنيع بعض الفواكه والخضار كالتفاح والخوخ والبطاطا المقطعة غاز ثاني أوكسيد الكبريت أو محاليل مخففة للكبريتيت وخاصة كبريتيت الصوديوم $Na_2\ S_2O_5$ ويستعمل هدروكبريتيت الصوديوم $Na\ HSO_3$ أو ميتاهدرو كبريتيت الصوديوم Sodium metabisulfite $Na_2\ S_2O_5$ وجميعها تعمل بمثابة مثبطات لأنزيم الفينولاز Phenolase . يمكن لغاز ثاني أوكسيد الكبريت النفوذ بسرعة في الفواكه والخضراوات الا انه الناحية العملية يفضل استخدام المحاليل المذكورة اعلاه وخاصة محلول الكبريتيت لسهولة استعمالها .

يمكن استخدام غاز SO_2 أو محلول الكبريتيت في تصنيع المنتجات الغذائية التي لا يمكن تعريضها للحرارة تجنبا للتغيرات الطارئة على قوامها أو

نكهتها كما تفيد هذه المواد في منع تفسخ الأغذية لخاصيتها المعقمة Antiseptic إضافة إلى فائدتها في حفظ فيتامين C من التلف.

وجد Ponting (1960) بأن غاز ثاني أوكسيد الكبريت مثبط لأنزيم ال Phenolase بتراكيز واطئة وحتى بتركيز جزء في المليون IPPM. وفي سلسلة من التجارب تم فيها إضافة تراكيز مختلفة من كبريتيت الصوديوم إلى كميات محددة من الكايتكول Catechol في محلول دارىء Buffer وجد Ponting بأن أنزيم الفينولاز Phenolase النقى جزئيا يثبط بنسبة 2٪ بوجود جزء في المليون SO_2 وبنسبة 100٪ بوجود عشرة أجزاء في المليون شكل (2-11)

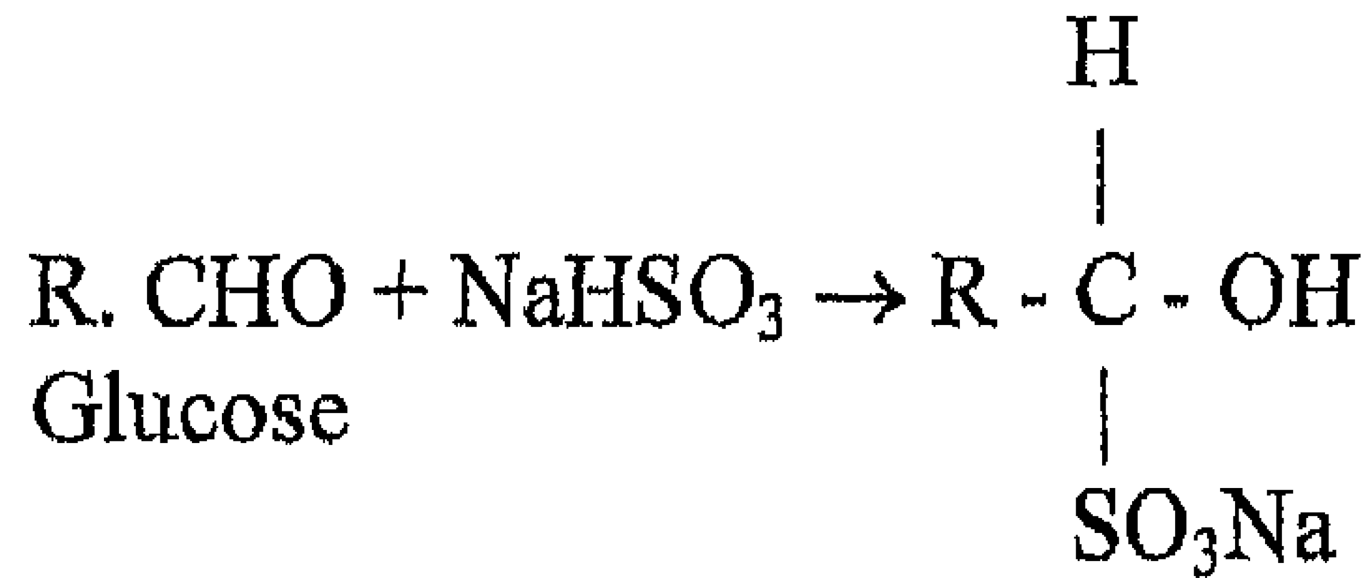


شكل 2-11 تأثير SO_2 التثبيطي لنشاط الانزيم Phenolase تمت إضافة SO_2 بشكل $NaHSO_3$ إلى أحجام ثابتة من محاليل الدارئ (Buffer) الحاوي على الركيزة Catechol وأعقب ذلك إضافة الأنزيم Phenolase المنقى جزئيا.

الوقت بالدقائق الامتصاص في 410 نانوميتر

وجد Mapson (1965) بأن كفاءة الكبريتيت في تثبيط الأنزيم Phenolase في شرائح البطاطا، تعتمد على الرقم الهدروجيني للمحلول الذي توجد فيه ووجد بأن أفضل رقم هدروجيني هو 6.0.

إن SO_2 الحر هو الصيغة الفعالة للمثبط لمنع حدوث تفاعلات الإسمرار ولقد وجد بأن بعضا منه. أو من الكبريت المضافة للأغذية- يتفاعل مع مجاميع الالدهيد أو الكيتون لتكوين مركبات مضافة Addition Compounds وبذلك لا يستطيع أن يشارك في تثبيط الأنزيم Phenolase. يتفاعل $NaHSO_3$ مثلا مع الكلوكوز ليكون x - Hyrdoxysulfonate كما في المعادلة الآتية:



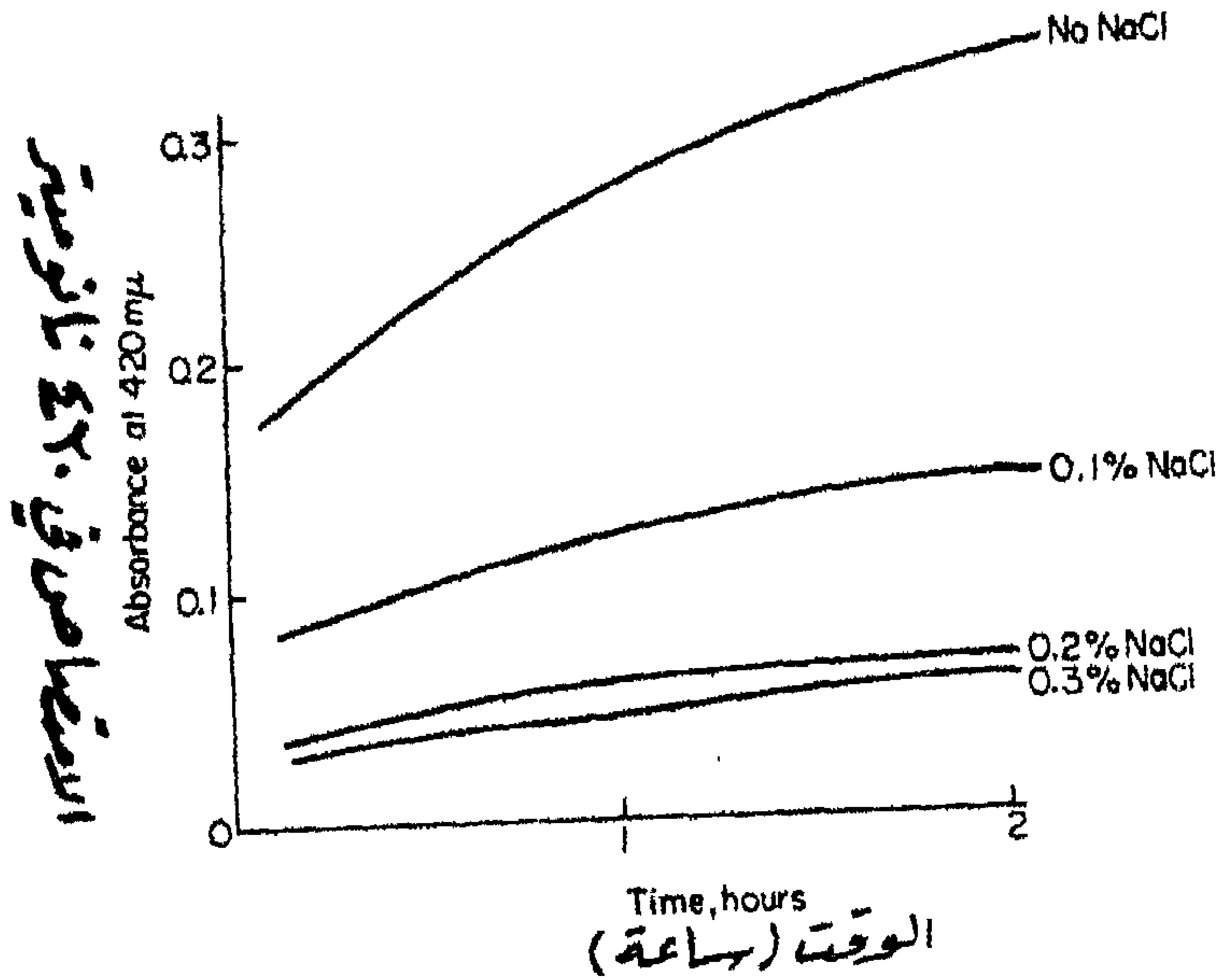
(11-2) ...

ولهذا يضاف عند التصنيع الغذائي- تراكيز من الكبريتيت أو SO_2 تضمن وجود كميات كافية من هذه المواد بشكلها الحر غير المؤكسد لتثبيط فعالية الأنزيم مع مراعاة عدم الإفراط فيها لتجنب تغيّر النكهة.

هناك بعض المساوىء لاستخدام SO_2 أو الكبريتيت لمنع تفاعلات الإسمرار فهي تؤدي إلى تلف فيتامين B_1 Thiamine كما أنها تعجل من صدأ العلبة المستخدمة في التعليب كما قد تؤدي إلى قصر Bleaching اللون الطبيعي للأغذية إضافة إلى اكتساب المنتوج الغذائي لنكهة ورائحة متميزة وغير مرغوبة. ويمكن التغلب على تغيرات النكهة بالتخلص من الفائض من SO_4 عن طريق التفريغ Vacuum، الطبخ، أو بطريقة كيميائية كاستعمال H_2O_2.

4. استعمال ملح الطعام مثبطا لأنزيم الفينولاز Phenolase

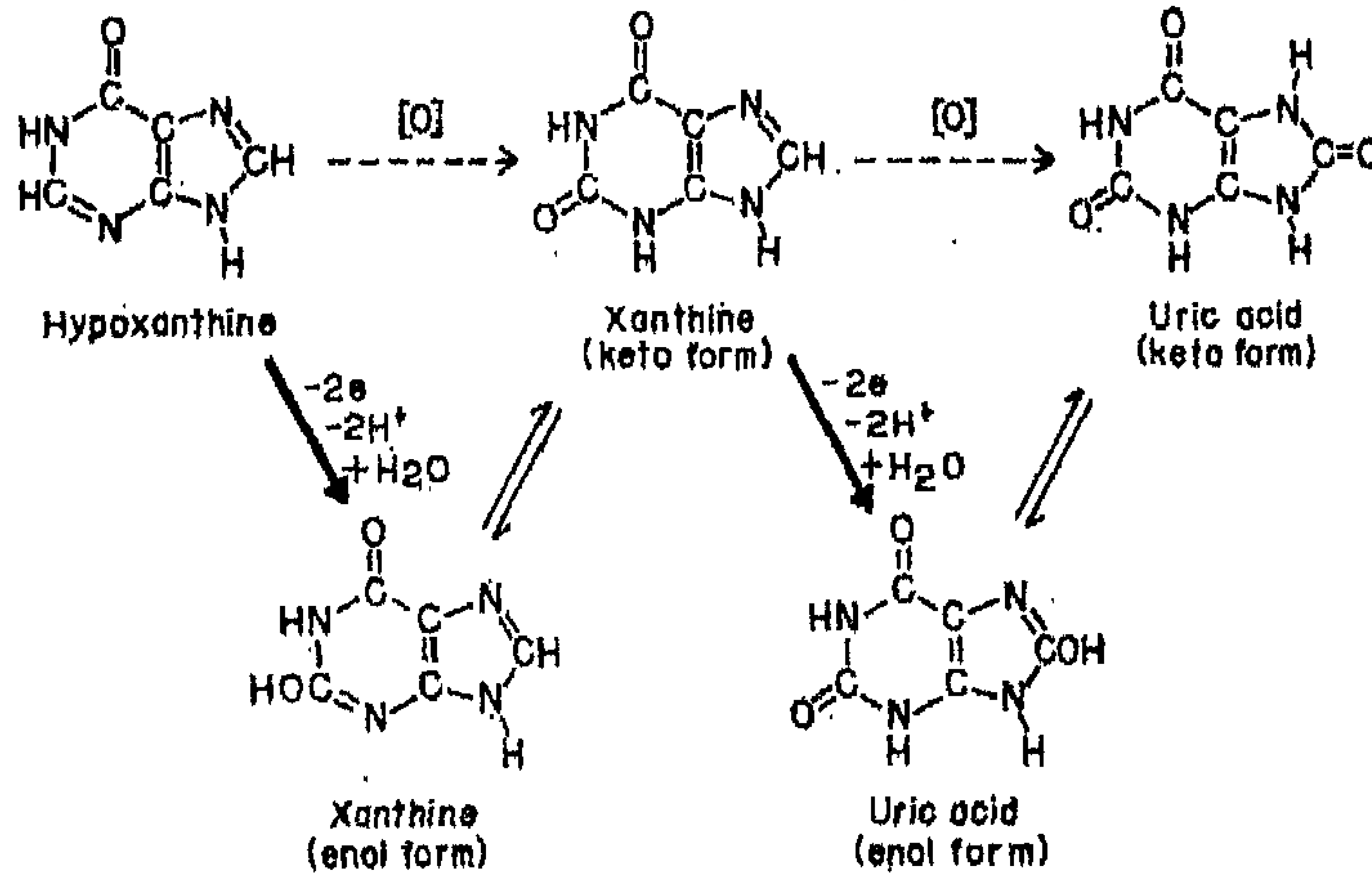
إن لملح الطعام (NaCl) فائدة محدودة في إبطاء تفاعلات الإسمرار، فعند استخدامه بتراكيز تتراوح بين 0.1٪ و0.3٪ في مزيج التفاعل الحاوي على الركيزة حامض الكلوروجنك Chlorogenic في محلول دارىء ذي رقم هيدروجيني 5.0، يثبط الأنزيم Phenolase المحضر من التفاح (شكل 2-12) إلا أن استعماله محدود بالنسبة للفواكه نظرا للتراكيز الملحية العالية نسبيا غير المستساغة والواجب استخدامها للتثبيط الأنزيمي.



شكل 2- 12 تأثير ملح الطعام في أكسدة المركب Chlorogenic acid من قبل إنزيم الفينولاز Phenolase المستخلص من التفاح

2-6-2 اوكسيداز الزانثين Xanthine Oxidase

اكتشف هذا الأنزيم حوالي عام 1900 في أنسجة الثديات ولقد كان يدعى Shardinger Enzyme. يحفز اوكسيداز الزانثين أكسدة الزانثين Xanthine والهيبوزانثين Hypoxanthine إلى حامض اليورك Uric acid كالآتي؛



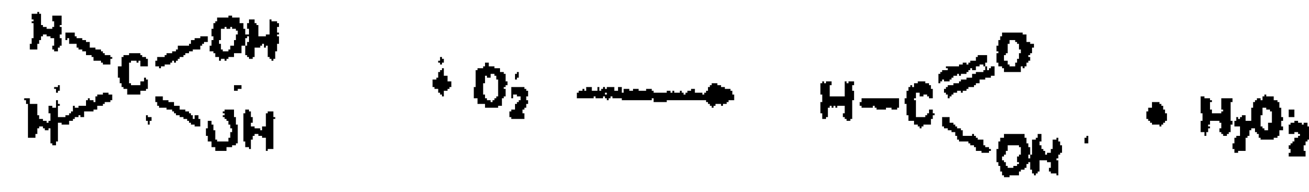
شكل 2- 13 تحول الزانثين والهيبوزانثين Hypoxdnthine

بفعل أنزيم اوكسداز الزانثين

وفي حوالي الفترة التي تم فيها اكتشاف اوكسيداز الزانثين، اكتشف أنزيم في الحليب يحفز تأكسد الالدهيدات إلى حوامض كربوكسيلية (معادلة 2-12) ولم يعرف حتى عام 1935 بأن هذا الأنزيم والأنزيم المحفز لتكوين حامض اليوريك يمثلان أنزيما واحداً ولهذا يدعى هذا الأنزيم في بعض المصادر بـ:

Ec. 1.2.3.2. Xanthine- aldehyde oxidase

إن اوكسيداز الزانثين (التسمية النظامية Xanthine-Oxygen Oxidoreductase واسع الإنتشار في الثديات وخاصة في حليب الأبقار وكبد العجل ويمكن الحصول عليه بصورة نقية من الحليب.



(12 -2) ...

يمتلك اوكسيداز الزانثين فعالية تحفيزية تجاه العديد من المركبات المانحة للالكترونات ولهذا يسمى غيرتخصصي (Non-Specific). وتتفاوت سرعة الأكسدة الأنسيابية لهذه المركبات تفاوتا كبيرا ويعد المركبان زانثين وهيبوزانثين أفضل ركيزتين للأنزيم كما في الجدول (2-3).

جدول (2-3) خصوصية الأنزيم Xanthine oxidase المستخلص من الحليب والسرع النسبية للتفاعل بوجود الركائز المختلفة.

Substrate	Relative rates	Substrate	Relative rates
Xanthine	140	Acetaldehyde	0.72
Hypoxanthine	100	Cinnamaldehyde	0.41
8-Hydroxypurine	6	Vanillin	0.01
6- Amino-2 -hydroxypurine	4.5	Glyceraldehyde	0.014
6- Amino-8 – hydroxyprine	7	p-phthalaldehyde	0.013
Adenine	6	Decanaldehyde	0.0080
2.8- Dihy droxypurine	0.6	n-Butyraldehyde	0.0060
p-Hydroxybenzaldehyde	1.3	octaldehyde	0.0002
Benzaldehyde	0.8		

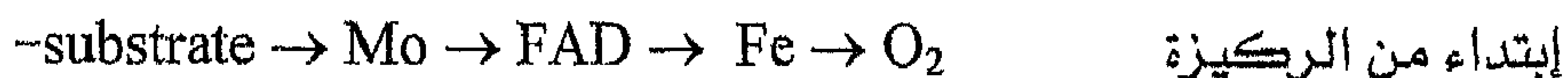
يتضح من المعادلة (2-12) بأن الأوكسجين هو المستقبل للالكترونات كما يمكن لعدد كبير من الأصباغ مثل Methylone blue و2.6-Dichlorophenolindophenol و Triphenyltertazolium chloride و phenazine methosulfate و cytochrome و Ferricyanide ان تعمل بمثابة مستقبلات للالكترونات في تفاعلات هذا الأنزيم.

للأنزيم المستخلص من الحليب وزن جزيئي يقدر بـ 275000 ويحتوي في مول واحد من البروتين ما يلي:

2 مول FAD، 2غم- دري موليبدنيم (Mo)، 8 غم- ذري حديد لاهيمي Nonheme iron و8 مول كبريتيد غير مستقر Labile sulife ويمكن للأخير (الكبريتيد) أن يتحرّر بسهولة من البروتين بشكل H_2S في محيط حامضي أو عند التسخين في PH= V. يرتبط الفلافين وأيونات الحديد فالمولبدينوم بصورة وثيقة بالجزء البروتيني ولا يمكن إزالتها بالديال Dialysis ولكن تمسخ الأنزيم بالحرارة أو الحامض يؤدي إلى تحرر الفلافين والأيونات وينتج عن ذلك فقدان الفاعلية الأنزيمية بصورة تامة، كما يمكن إزالة الفلافين بمعاملة الأنزيم بكلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) إذ تؤدي إلى تحلل FAD إلى FMN ضعيف الإتصال بالأنزيم وبذلك ينفصل عنه بسهولة.

لا يعرف على وجه التحديد فيما إذا كان للأنزيم xanthine oxidase موقع نشط واحد أو إثنان ويمكن توضيح فعاليته التحفيزية في أكسدة الزانثين والهيبوزانثين بالمخطط شكل (12-14) والذي يوضح إختزال الأوكسجين الجزيئي بواسطة سلسلة لنقل الإلكترونات يساهم فيها المولبدينوم والFAD والحديد وبالتسلسل الآتي:

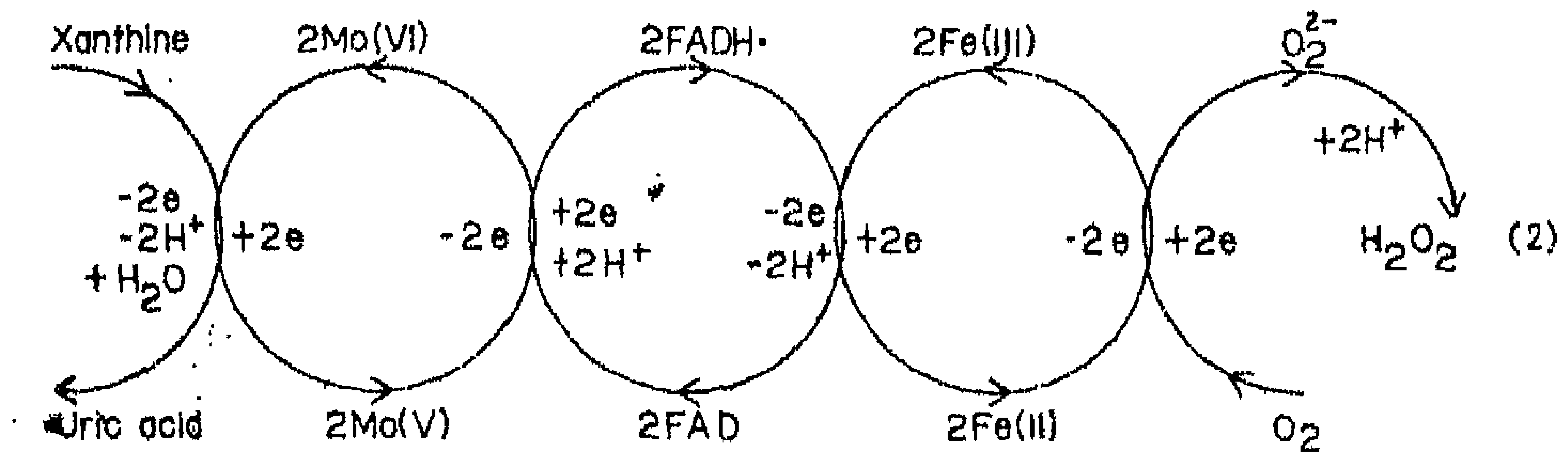
إبتداء من الركيزة



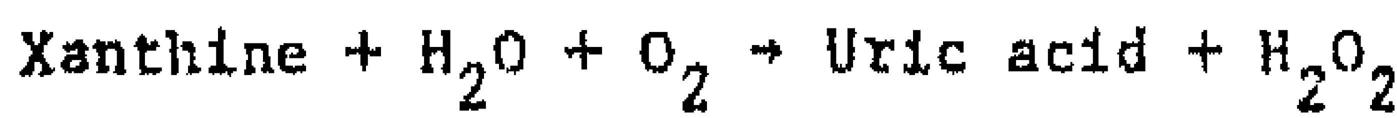
-substrate → Mo → FAD → Fe → O_2

نقطة تساوي التكهرب للأنزيم Xanthine oxidase Isoelectric point تتراوح بين 5.3 و5.4 ويكون الأنزيم في أقصى فعاليته في الرقم الهيدروجيني 8.3.

يمكن الإستفادة من هذا الأنزيم في تكنولوجيا الألبان إذ أن إزالة لون صبغة المثيلين الزرقاء Methylene blue وتحولها إلى عديمة اللون بوجود الفورمالدهيد كمانح للإلكترونات. مؤشر جيد لطزاجة الحليب ومن جهة أخرى فإن تمسخ الأنزيم بالحرارة يؤدي إلى بقاء لون الصبغة وبذلك يعد هذا الإختبار وسيلة للتفريق بين الحليب الطازج والمغلي.



Overall reaction: التفاعل الاجمالي



Xanthine + H_2O + O_2 → Uric acid + H_2O_2

2-14 الفعالية التحفيزية لاوكسداز الزانثين. يوضح المخطط اختزال الأوكسجين الجزيئي بواسطة سلسلة لنقل الالكترونات يسهم فيها المولبدينوم وFAD والحديد والتي تشكل جزءا من الأنزيم

2-6-3 أوكسداز الكلوكوز Glucose Oxidase

(β-D- Glucose: oxygen oxidoreductase: Ec 1.1.3.4)

إكتشف Muller هذا الأنزيم عام 1928 في الأعفان Aspergillus niger وpenicillium glaucum. يحفز أوكسيداز الكلوكوز أكسدة: دي-كلوكوز D-glucose إلى 8-gluconolactone بوجود جزيئة أوكسجين

وهوبذلك يعد من الأنزيمات النازعة للهدروجين هوائياً Aerobic dehydrogenase إذ ينقل ذرتي الهيدروجين من الركيزة إلى الأوكسجين الجزيئي:



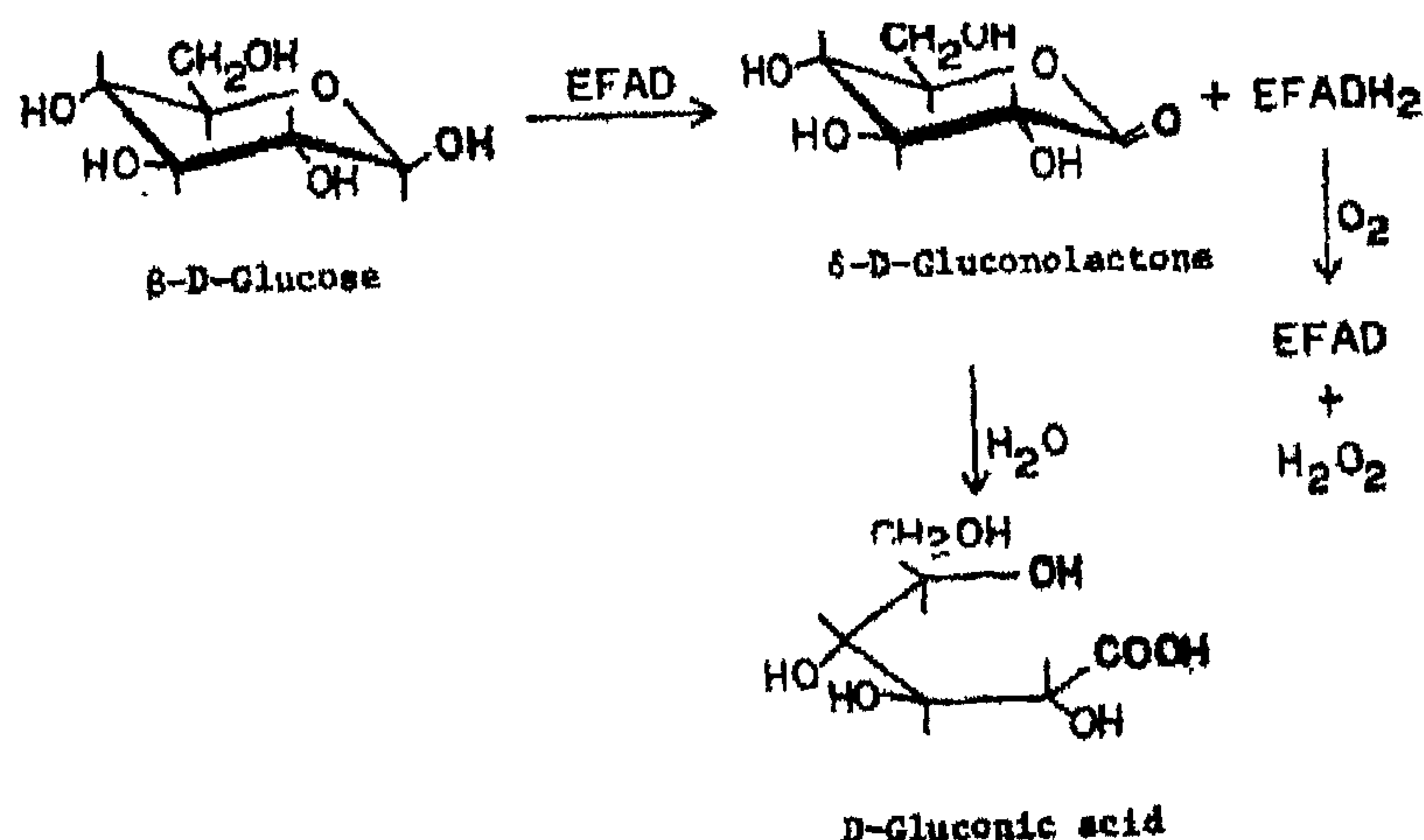
$$AH_2 + O_2 \rightarrow A + H_2O_2 \qquad (13-2)....$$

2-6-3-1 آلية التفاعل:

يرتبط الأنزيم بصورة وثيقة بالمجموعة الضميمة FAD وعندما تكون بالصيغة المؤكسدة EFAD ، تنتزع ذرتي هدروجين من الركيزة β-D- glucose لتتحول إلى الصيغة المختزلة $EFADH_2$ وينتج عن التفاعل تكوين δ-Gluconolac tone الذي يتحلل مائياً- وليس أنزيمياً- بعدئذ لتكوين حمض الكلوكونك D-Gluconic.

تشير بعض المصادر إلى أنه إضافة إلى إمكانية تحلل δ-Gluconolactone بالماء إلا أن هناك أنزيماً آخر يدعى lactonase يستطيع تحفيز التحول ذاته ويوجد عادة في التحضيرات الحاوية على أوكسيداز الكلوكوز.

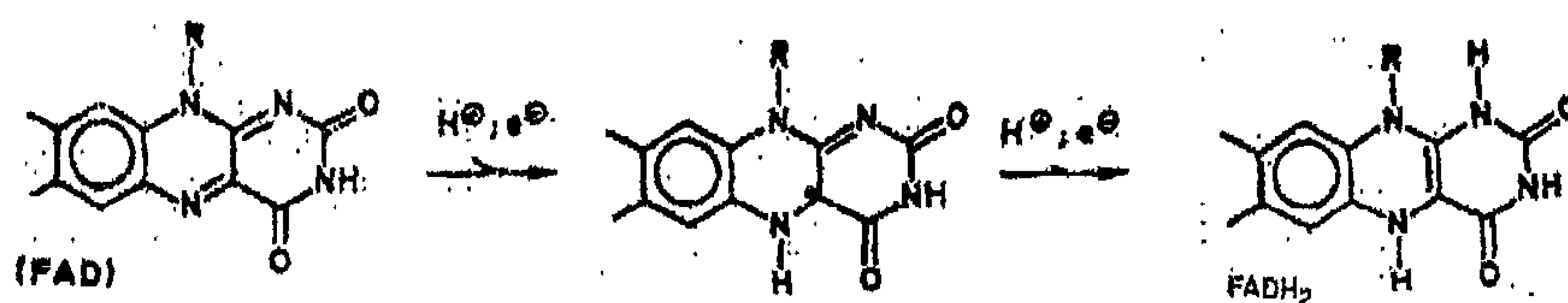
أما اوكسيداز الكلوكوز المختزل $EFADH_2$ فإنه يتأكسد مرة أخرى بواسطة جزيئة أوكسجين ويمكن توضيح خطوات التفاعل بالشكل 2-15.



شكل 2- 15 أكسدة B - D - Glucose بفعل الانزيم أوكسداز الزانثين EFAD

لاحظ دور المجموعة المرتبطة FAD في عملية التحفيز

إن اختزال المجموعة الضميمة FAD التي تعد Flavoquinone يتم على مرحلتين كالآتي (معادلة 2-14):

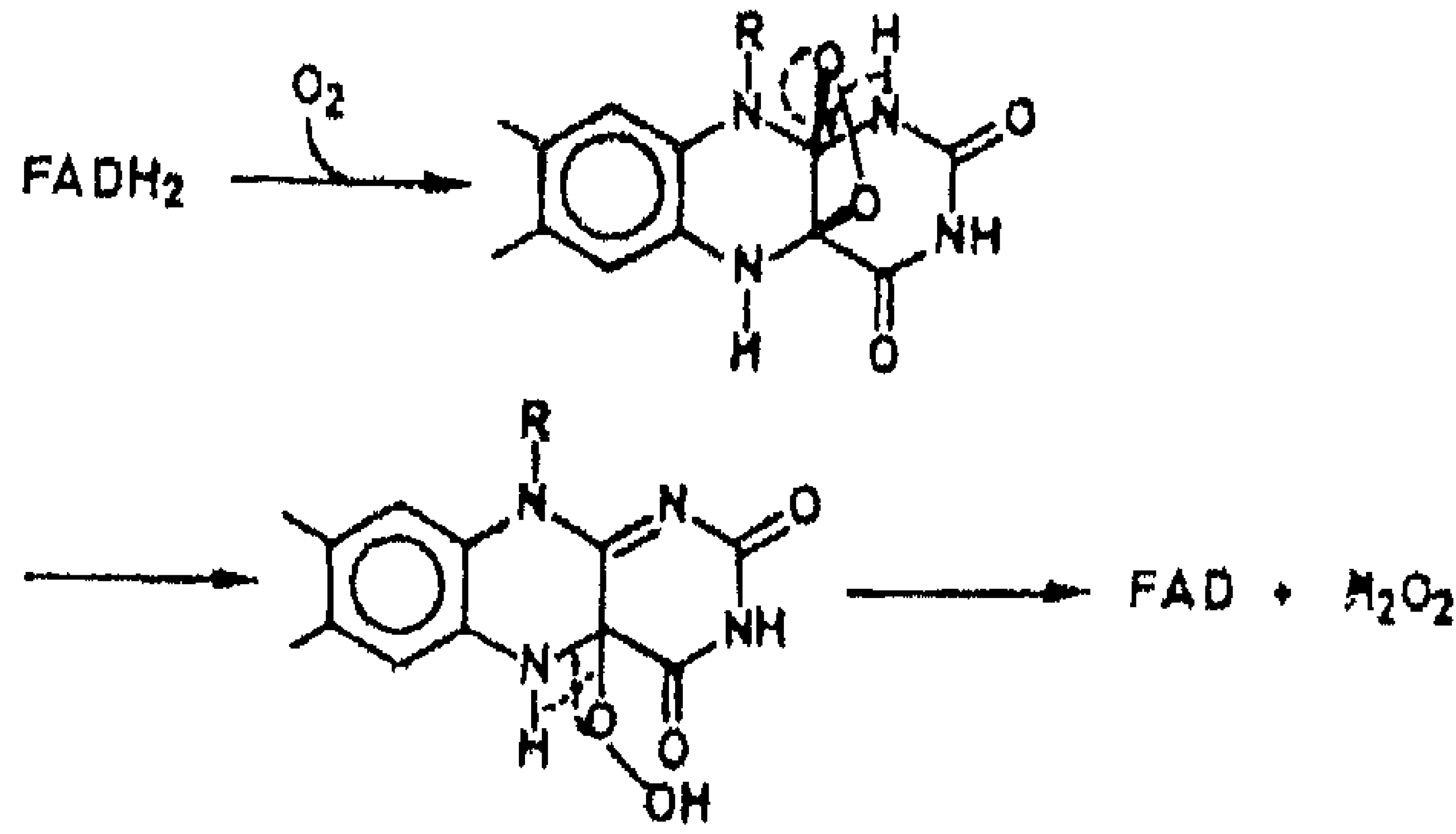


فلافوسيمي كوينون

(14 -2) ...

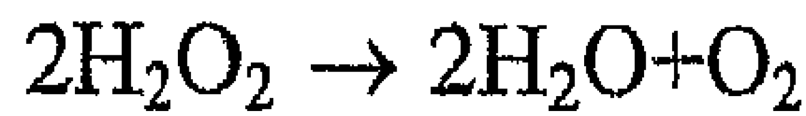
ملاحظة: تمثل R ما تبقى من الجزيئة، أنظر الفقرة 1-4-2

وعند إعادة أكسدتها، تنتقل الإلكترونات إلى الأوكسجين الجزيئي لتكوين H_2O_2 كما يأتي (معادلة 2-15).



(15 -2) ...

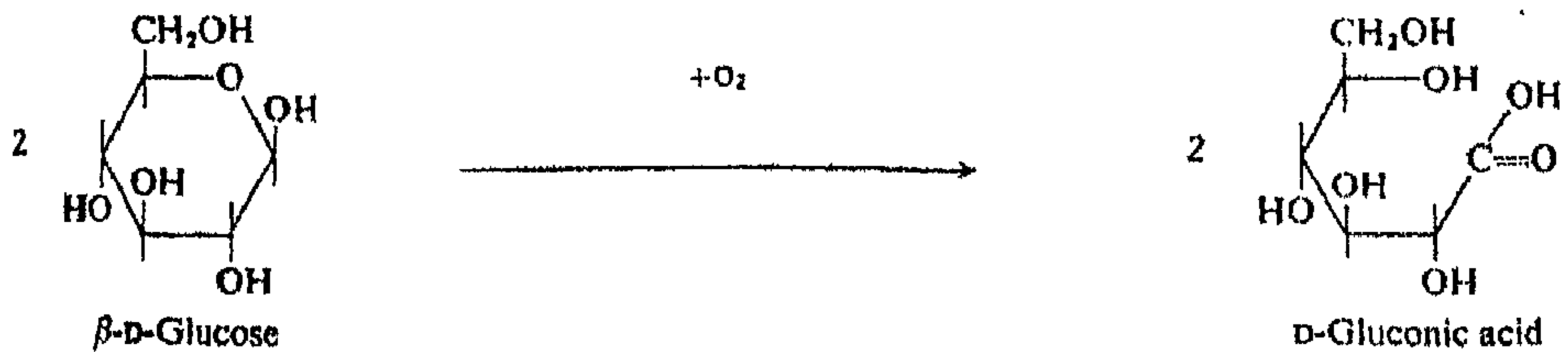
يوجد أوكسداز الكلوكوز الخام المحضر لإنتاج حمض الكلوكونك صناعياً كأنزيم خلوي مع الأنزيمين lactonase و Catalase. يحفز أنزيم الكاتالاز catalase التفاعل الآتي:



$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O+O_2$$

(16-2) ...

وبذلك يمكن كتابة المعادلة الإجمالية للتفاعل المحفز بالأنزيمات الثلاثة oxidase Glucose و Lactonaseو Catalase كالآتي:-



2-6-3-2 الإستخدامات الصناعية:

بما أن اوكسداز الكلولوز يعمل على إزالة الأوكسجين، فأنه يضاف إلى الأغذية التي يتأثر لونها أو نكهتها بتأكسدها نتيدة للأوكسجين. ومثال على ذلك البيرة والنبيذ وعصير الفواكه.

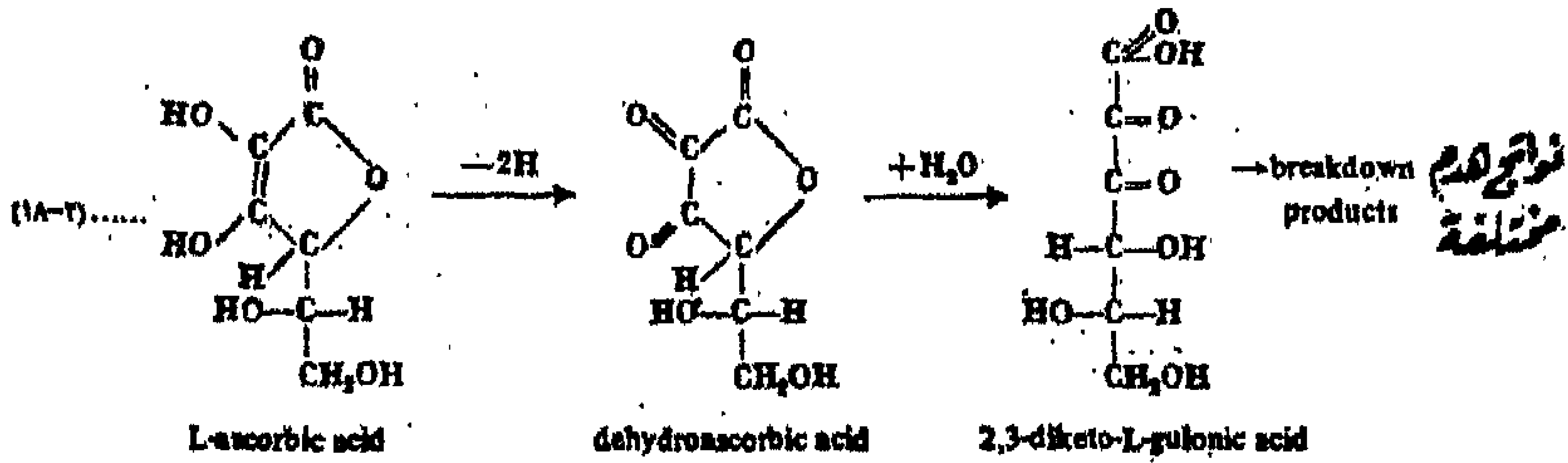
كما يستخدم هذا الأنزيم لإزالة الكميات القليلة من الكلوكوز في بعض الأغذية سابقاً لتجفيفها ذلك لأن الكلوكوز يتفاعل مع البروتينات عند التجفيف لتكوين مركبات داكنة اللون بتفاعل يسمى Maillard reaction وهذا ما يحصل عند إنتاج مسحوق البيض أو بودرة الحليب.

يستخدم اوكسداز الكلوكلوز مختبريا لتقدير سكر الدم.

2-6-4 اوكسداز حامض الإسكوربك Ascorbic acid oxidase

اوكسداز حامض الإسكوربك

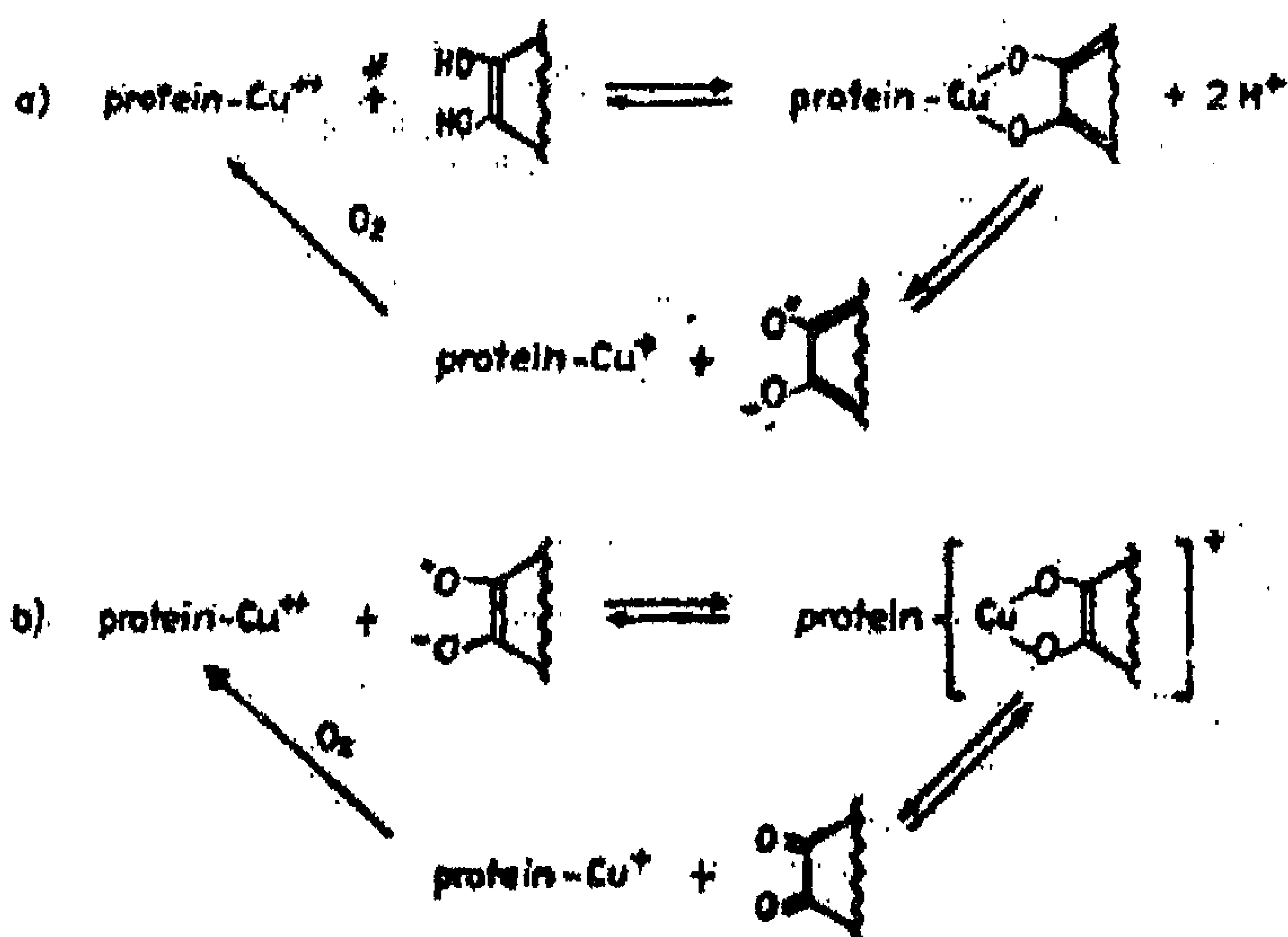
L- ascorbate: 02 oxidoreductase; ECI.10.3.3 يؤكسد حامض الإسكوريك إلى dehydroascorbicacid ويكون التفاعل غير عكوس نظراً لإن الناتج dehydroascorbic قلق جداً ويتحول بسهولة إلى مركبات أخرى، فمثلاً عند انفتاح حلقة اللاكتون Lactone ring يتحول إلى diketo-L- gulonic acid 2.3 ذي السلسلة المفتوحة:



وعند فقدان CO_2 وماء يتكون مركبات أخرى يمكن أن تتبلمر polymerize إلى رانتجات بنية Brown resing (معادلة 2-18) تكسب عصير الفواكة الحمضية وخاصة الليمون وعصير الكريب فروت Grape fruit المركز لوناً بنياً، كما تحدث الأكسدة الأنزيمية للخضراوات الحاوية على فيتامين C (حمض الإسكوربك) أثناء الحصاد أوالنقل أو الخزن كالسبانخ والبازلاء والفاصوليا واللوبيا.. الخ.

2-6-4-1 آلية عمله :

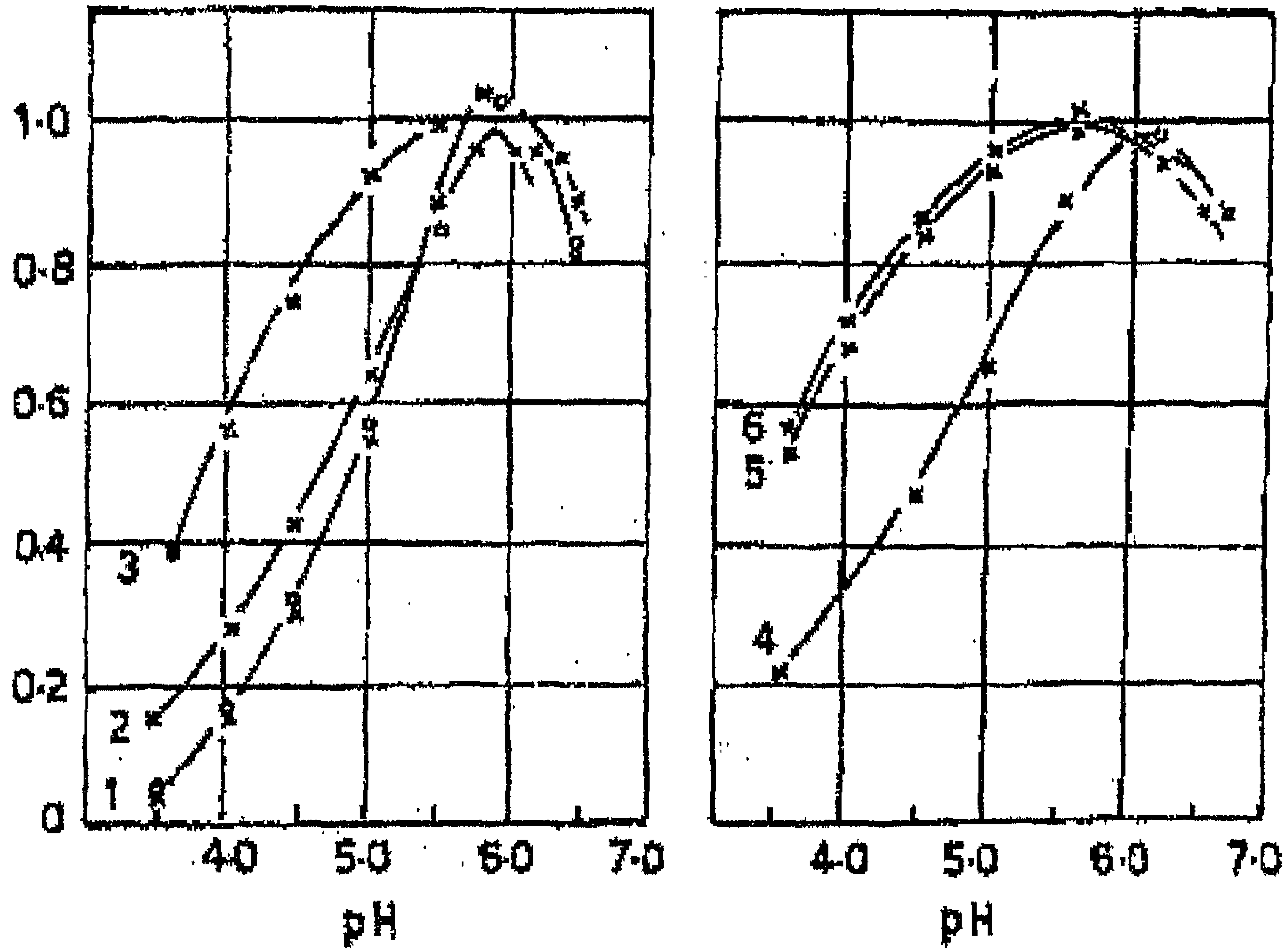
يحوي اوكسداز حامض الإسكوربك على أيون النحاس في الموقع النشط شأنه بذلك شأن أنزيم الPhenolase ويمكن توضيح دور أيونات النحاس بالمخطط الآتي:-



شكل 2- 16 آلية عمل الانزيم Ascorbate oxidase في تحويل حامض الاسكوربك إلى Dehydroascorbic acid ودور أيون النحاس في الموقع النشط

2-6-4-2 تأثير الرقم الهدروجيني في نشاط أنزيم اوكسداز حامض الإسكوربك

تظهر الفعالية القصوى لأوكسداز حامض الإسكوربك في الرقم الهيدروجيني (5.3-6) وتنخفض الفعالية بشكل ملحوظ عند انخفاض الرقم الهيدروجيني. يوضح الشكل 2-17 علاقة الفعالية الأنزيمية بالرقم الهيدروجيني وتبعاً لمصدر الأنزيم.



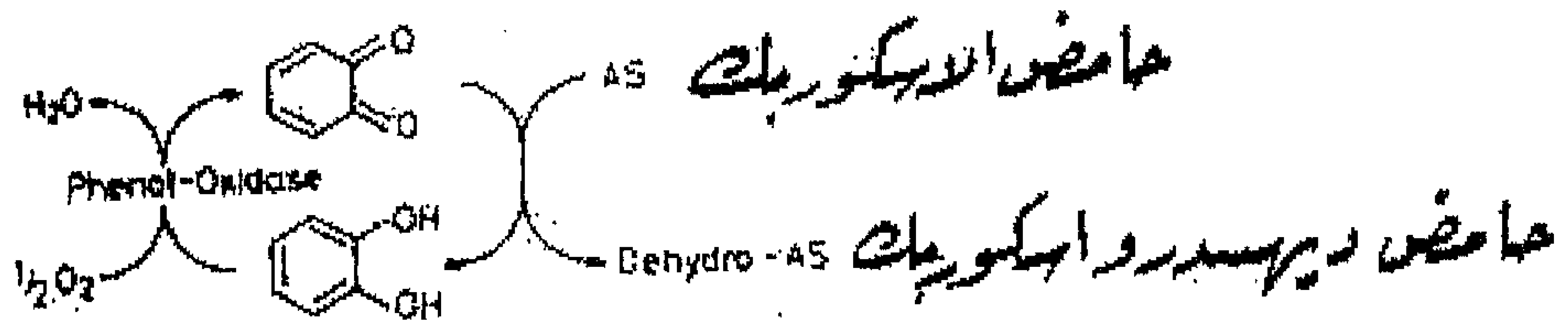
شكل 2- 17 تأثير الرقم الهدروجيني في الفعالية الأنزيمية لاوكسداز حامض الاسكوربك المستخلص من مصادر مختلفة 1. الخيار، 2. القرع، 3. القرنابيط، 4. الكرنب، 5. اللوبيا، 6. الجزر الأصفر.

يتضح من الشكل بأن الأنزيم يفقد فعاليته عندما ينخفض الرقم الهدروجيني إلى أقل من (3) وبهذا لا يخشى من نشاط هذا الأنزيم في الأغذية الحامضية مثل الكرنب المخلل Sauer kraut.

2-6-4-3 أكسدة حامض الإسكوربك بأنزيمات أخرى

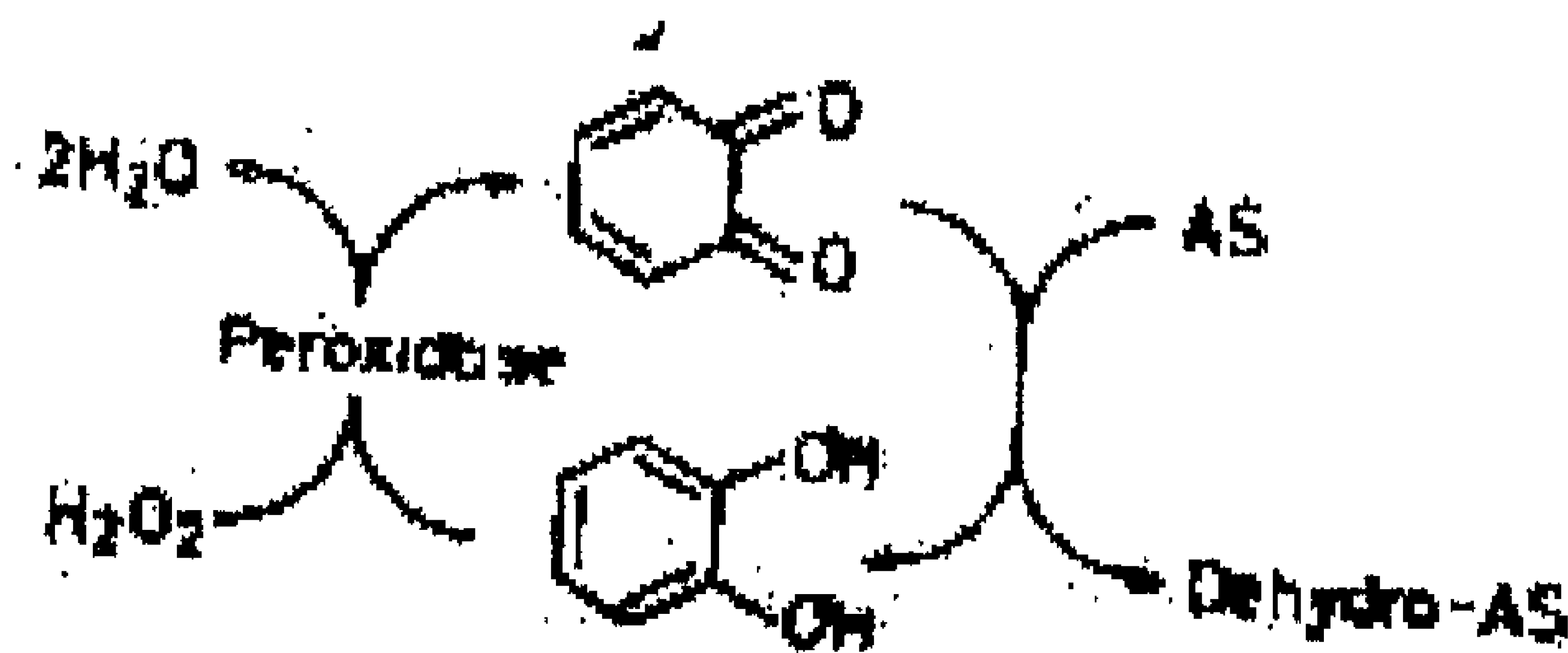
إضافة إلى اوكسداز حامض الإسكوربك، هناك أنزيمات أخرى تؤكسد حامض الإسكوربك مثل الفينولاز phenol oxidase ؛Phenolase الحاوي على النحاس والبيروكسداز peroxidase وأوكسداز السايتوكروم Cytochrome

oxidase وكلاهما يحوي على الحديد في الموقع النشط، إلا أن هذه الأنزيمات تختلف عن اوكسداز حامض الإسكوربيك الذي يؤكسد حامض الإسكوربيك هوائياً. فهي تؤكسده بصورة غير مباشرة إذ ينتج عن التفاعلات التي تحفزها مركبات تعمل بمثابة ناقلات للالكترونات مؤدية بالتالي إلى أكسدة حامض الإسكوربيك كما في المعادلة التالية (2-19) للتفاعل الأنزيمي المحفز باوكسداز الفينول



(19 -2) ...

وبطريقة مشابهة يعمل أنزيم البيروكسداز (معادلة 17) الذي يؤدي بسلسلة تفاعلات إلى أكسدة حامض الإسكوربيك إلى Dehydroascorbic.

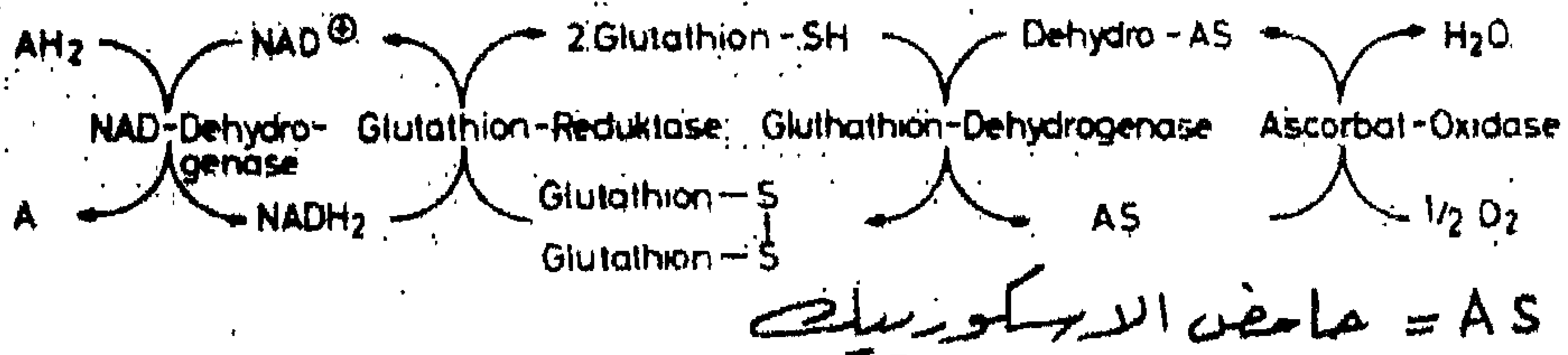


(20 -2) ....

2-6-4-4 نوعية اوكسداز حامض الإسكوربك Specificity

يمكن أن يحفز اوكسداز حامض الإسكوربك أكسدة الركائز المشابهة للحامض L- Ascorbic، فمثلا الأنزيم الموجود في البكتريا Aerobacter aerogenes يؤكسد الركيزة Isoascorbate -D أيضاً بينما لا تتأكسد مركبات الفينول و p-Cresol و pyrogallol و Hydroxyquinone وCysteine والكلوتاثايون المختزل GSH، Glutathione بهذا الأنزيم.

يلعب واكسداز حامض الإسكوربك دوراً مهما في العمليات الأيضية في النباتات إذ ينقل ذرات الهدروجين في المرحلة الأخيرة لتفاعلات الأكسدة المؤدية إلى انتزاع ذرات الهدروجين من الركيزة المختزلة وانتقالها إلى الأوكسجين الجزئي كما في المعادلة التالية التي توضح سلسلة تفاعلات أكسدة واختزال تسهم فيها أربعة أنزيمات ابتداء بالأنزيم النازع للهدروجين ذي المجموعة الإسكوربك:



(21 -2) .....

2-6-4-5 الأهمية التكنولوجية

يؤدي اوكسداز حامض الإسكوربك إلى تقليل محتوى فيتامين C وينتج عن ذلك عدم استقرار لون ونكهة المنتجات النباتية مثل عصير الفواكه وخاصة إذا لم يتم سحب الأوكسجين (الهواء) منها.

إن انخفاض نسبة حامض الإسكوربك والذي يعد مانعاً للأكسدة Antioxidant يؤدي إلى فسح المجال لنشاط أنزيمات اوكسداز أخرى مثل phenol oxidase وperoxidases. إضافة إلى الأكسدة الأنزيمية، يمكن هدم حامض الإسكوربك بأكسدته بواسطة أيونات المعادن الثقيلة ويمكن منع ذلك بواسطة مواد موجودة طبيعياً في الأغذية تشكل معقدات مخلبية Chelation complexes مع هذه الأيونات وتؤدي إلى الحد من سرعة تفاعلاتها ومن هذه المواد ما يأتي:

أ- الحوامض الأمينية مثل الكلايسين Glycine والكرياتين Creatine والكرياتنين Creatinine و والكلوماتك Glutamic والسستئين Cysteine.

ب- البروتينات.

ج- الحوامض الهدروكسيلية مثل حامض الستركCitric وحامض التارتارك Tartaric.

د- الحوامض ثنائية الكربوكسيل مثل حامض الاوكزالك Oxalic.

هـ- البكتينات أحادية وعديدة السكريد.

و- مركبات الـ Flavenoids والـTannins مثل Quercitol و Anthocyanins و Catechins

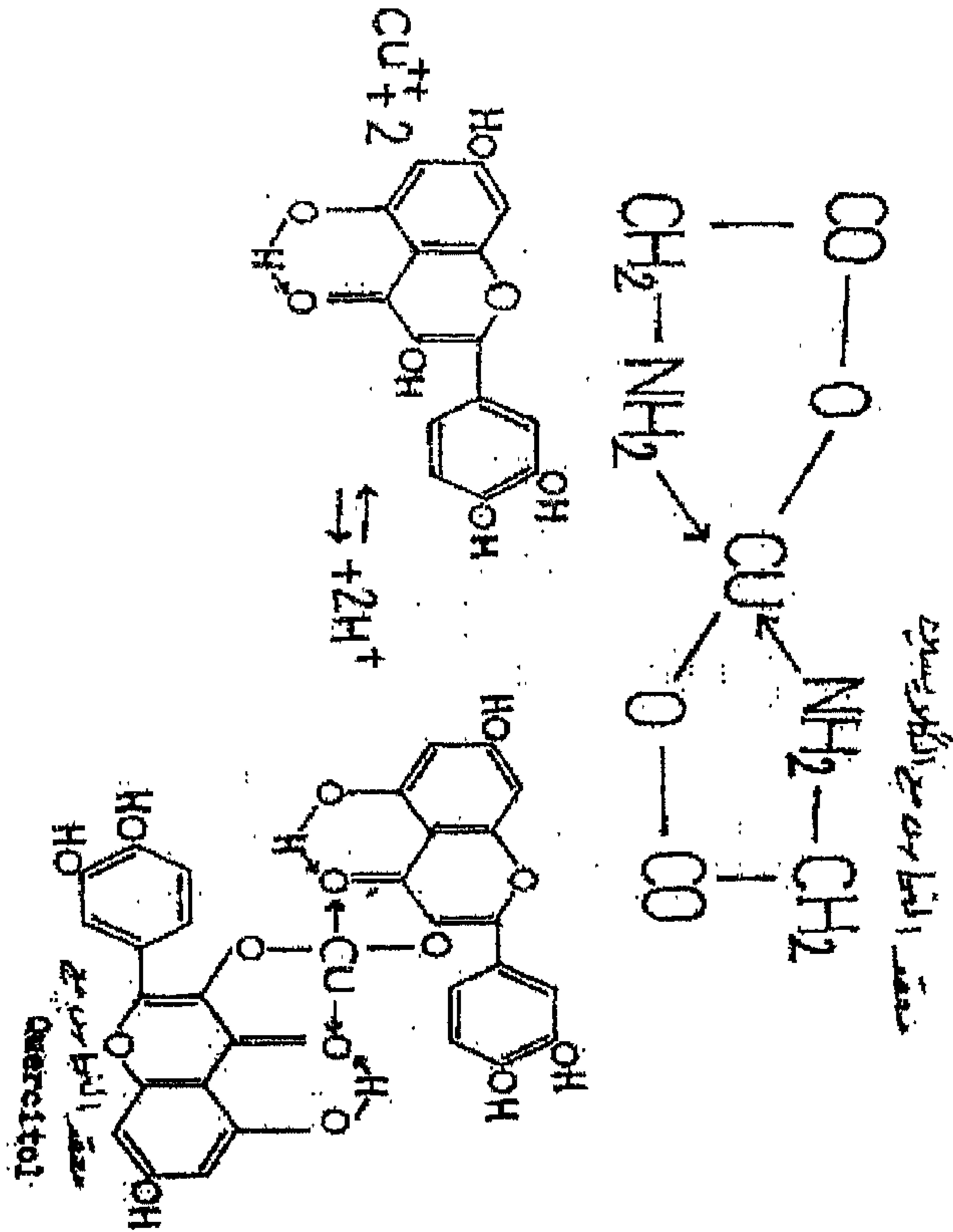
يوضح الشكل 2-17 A تكوين المعقدات المخلبية بين الكلايسين والنحاس Cupper glycinate وبين ال Qutercitol والنحاس.

إضافة إلى ما ذكر فإن محاليل البروتينات والسكريات والبكتينات تساعد بطريقة فيزيائية صرفة على التقليل من نفوذ الأوكسجين إلى داخل المنتوج الغذائي وذلك لتكوين اواصر هدروجينية بين فيتامين C ومجاميع >NH,Oh و>Co -CooH- الموجودة في تركيبها.

وأخيراً يمكن منع الهدم الأنزيمي لحامض الإسكوربك في الأغذية بتعريضها للماء الحار أوالبخار Blanching كالسلق مثلاً.

2-6-5 البيروكسداز peroxidase

ينتشر أنزيم البيروكسداز: hydrogen peroxide Oxidoreductase: Donor Ec.I.II.1.7 بصورة واسعة في النباتات العليا ويوجد بتراكيز عالية في نسغ التين Fig sap والفجل Horse radish كما يوجد في بعض الأنسجة الحيوانية وفي الأحياء المجهرية.



شكل A 17-2 تكون معقدات مخلبية بين النحاس والكلايسين وبين النحاس وال Quercitol

تمكّن Theorell عام 1943 من الحصول على بلورات هذا الأنزيم من الفجل ويمكن حالياً الحصول عليه بشكل بلوري من مصادر أخرى مختلفة.

يختلف أنزيم البيروكسداز المعزول من مصادر مختلفة في الخصائص الجزيئية، فالأنزيم المستخلص من الفجل يمتلك وزناً جزيئياً قدره 40000 في حين يمتلك بيروكسداز الحليب وزناً جزيئياً مقداره 82000. يقاوم بيروكسداز الفجل، درجات الحرارة العالية لصغر وزنه الجزيئي، فعند تسخينه في 85°م لمدة 30 دقيقة يفقد نصف نشاطه الأصلي فقط كما يظهر الأنزيم استقرارية Stability في مدى واسع للرقم الهدروجيني (4-12) بينما يعمل بفعالية قصوى في الرقم الهدروجيني 7.

2-6-5-1 أصناف أنزيمات البيروكسداز

يمكن تقسين البيروكسدازات إلى الأصناف الآتية:

أ. أنزيمات البيروكسداز الحاوية على الحديد

Iron-Containing peroxidases

توجد هذه المجموعة من البيروكسدازات في النباتات العليا مثل الفجل والفجل الياباني Japanese radish ونسغ التين والشلغم Turnip وفي الأحياء المجهرية (peroxidase of yeast Cytochrome C).

يحتوي هذا الصنف من البيروكسدازات على المجموعة الضميمة بروتوبرفرين III III protoporphyrin ويمكن فصلها عن الجزء البروتيني (صميم الأنزيم) بمعاملة الأنزيم بالأستون الحامضي.

تمتلك هذه الأنزيمات لونا بنياً في حالتها النقية

ب. **Verdoperoxidases:**

توجد هذه الأنزيمات في المايلوسيت Myelocyte ولهذا تسمى

Myeloperoxidase كما توجد في الحليب وتدعى Lactoperoxidase إضافة إلى وجودها في أنسجة مختلفة.

تشكل النواة Iron porphyrin المجموعة الضميمة لهذا الصنف من الأنزيمات عوضاً عن Ferriprotoporphyrin III الموجودة في المجموعة أ.

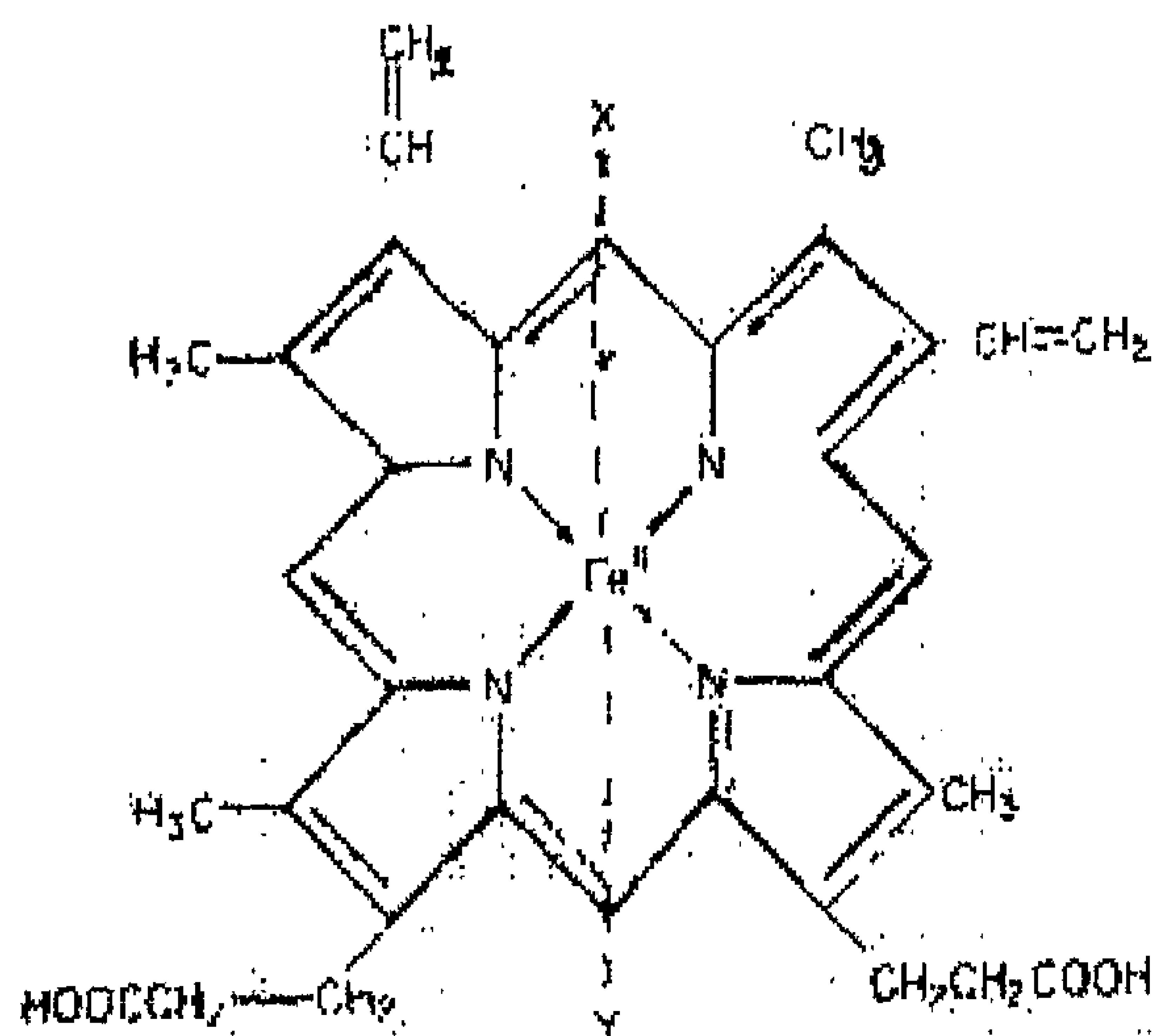
ولا يمكن فصلها بمعاملة الأنزيم بالاستون الحامضي أو بكبريتات الفضة. تمتاز الأنزيمات Meyeloperoxidase وLactoperoxidase ذات النقاوة العالية بلون اخضر لامتصاصها الضوء عند الطول الموجي 570-620 نانوميتر كما تمتص كذلك بالقرب من 4.3 نانوميتر.

جـ. Flavoprotein peroxidases

تم تنقية هذا الصنف من البيروكسدزات من أنواع البكتيريا العقدية Streptococcusومنها العقدية البرازية Streptococcus faecalis ومن العديد من الأنسجة الحيوانية. يشكل المركب FAD المجموعة الضميمة لهذه المجموعة من البيروكسدازات.

2-6-5-2 الخصائص الجزيئية لبيروكسداز الفجل Horseradish peroxidase:

الوزن الجزيئي لبيروكسداز الفجل 40000 وتحتوي الجزيئة الواحدة على مجموعة protohemin Ferri proto porphyrin III واحدة ويتضح تركيبها في الشكل (2-18).

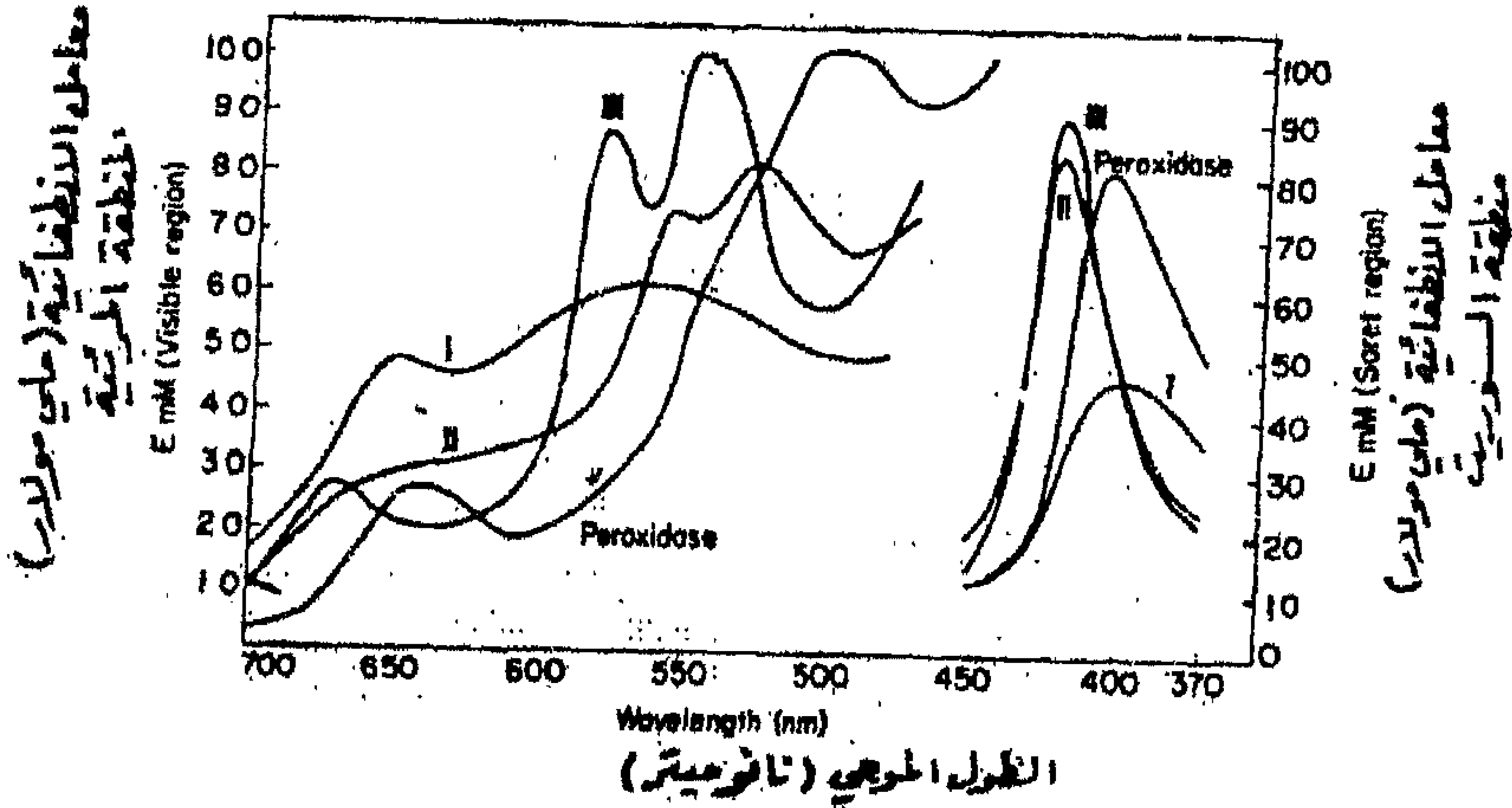


شكل 2- 18 : تركيب البروتوهيمين Protohemin; Ferriprotoporphyrin III

يتضح من الشكل وجود ست اواصر تناسقية تنقل أربع منها بالنتروجين العائد لحلقات البيرول pyrrole rings وأما الآصرتان الباقيتان x وy فإنهما تشغلان من قبل جزيئات الماء أو مجموعة الهدروكسيل (OH-) اعتماداً على الرقم الهدروجيني، وعند وجود البروتوهيمين في أنزيم البيروكسداز، تتصل إحدى الاصرتين (x أو y) بمجموعة الكاربوكسيل في البروتين بينما تتصل الأخرى بمجموعة أمينو أو بالماء.

يمكن إزالة البروتوهيمين من البروتين في −15°م بمعاملته بالاستون الحامضي دون أن يؤدي ذلك إلى تمسخ البروتين إلا أن الأخير لا يمتلك فعالية أنزيمية كما يظهر البروتوهيمين وحدة نشاطا قليلا جدا (أقل من 0.001٪) مقارنة بنشاط البيروكسداز وعند ارتباطهما يسترد الجزء الأكبر من الفعالية الأصلية.

بالنظر لوجوج البروتوهيمين، يمتلك أنزيم البيروكسداز قمم امتصاص عند الأطوال الموجبة 403 و 497 و 641 نانوميتر إضافة إلى قمة الإمتصاص عند 275 نانوميتر (للجزء البروتيني) شكل (2-19).



شكل 2- 19 طيف الامتصاص لإنزيم البيروكسداز ومركباته المحرضة بالبيروكسيد (I وII و III)، يمثل مقياس حزم السوريت Soret 0.1 من مقياس المنطقة المرئية، تمثل المركبات I وII التراكيب الموضحة في الشكل (2- 20). يتكون المركب III (أحمر ساطع) في التراكيز العالية لبيروكسيد الهدروجين

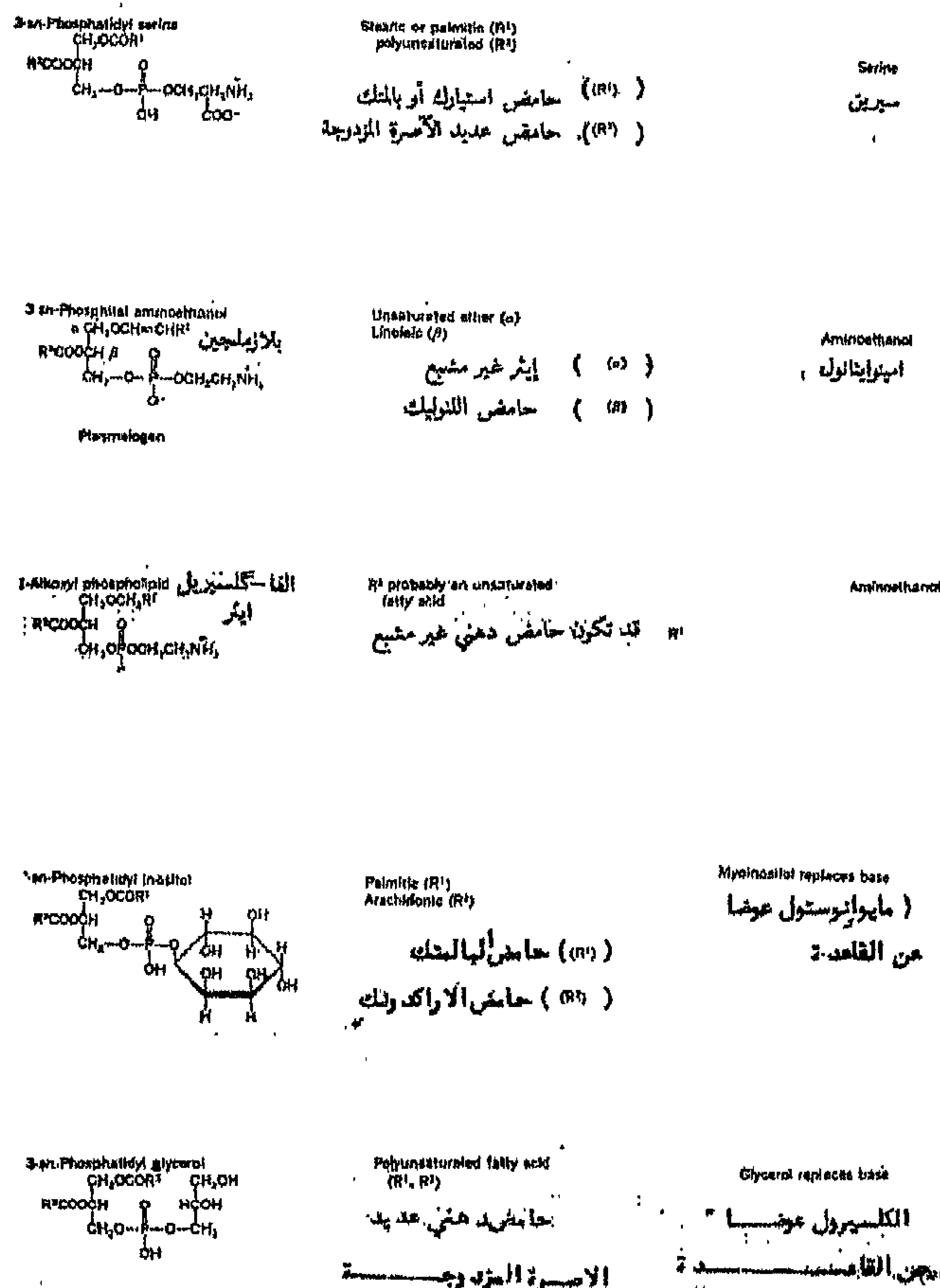
يمتلك أنزيم البيروكسيداز المتبلور الذي حصل عليه Theorell نسبة امتصاص عند 4.3 إلى 275 نانوميتر مقدارها 3.04 وتسمى Rz (المصطلح مختصر Reinheitszahl باللغة الألمانية وتعني درجة النقاوة). إذن تقدر درجة نقاوة الأنزيم بقمية Rz إلا أن هناك بعض المساوىء لإستعمال هذه القيمة للتعبير عن درجة النقاوة ومنها :

أ. تشير Rz إلى درجة نقاوة التحضير بوصفه بروتينا لا أنزيما.

ب. يتأثر الإمتصاص في 275 نانوميتر بوجود أيونات الحديدك اللاعضوية Fe^{3+}

بينما تؤثر شوائب البروتينات الهيمية Haemoprotein على الإمتصاص عند الطول الموجي 403 نانوميتر.

جـ- تختلف نسبة الإمتصاص عن 403 إلى 275 نانوميتر تبعا لمصدر أنزيم البيروكسداز وذلك لوجود ايزوأنزيمات مختلفة متباينة في محتواها من الأحماض الأمينية الأروماتية تمتلك الصيغ الجزيئية المختلفة (ايزوأنزيمات) لبيروكسداز الفجل قيم Rz تتراوح بين 2.50 و 4.19 (جدول 2-4).



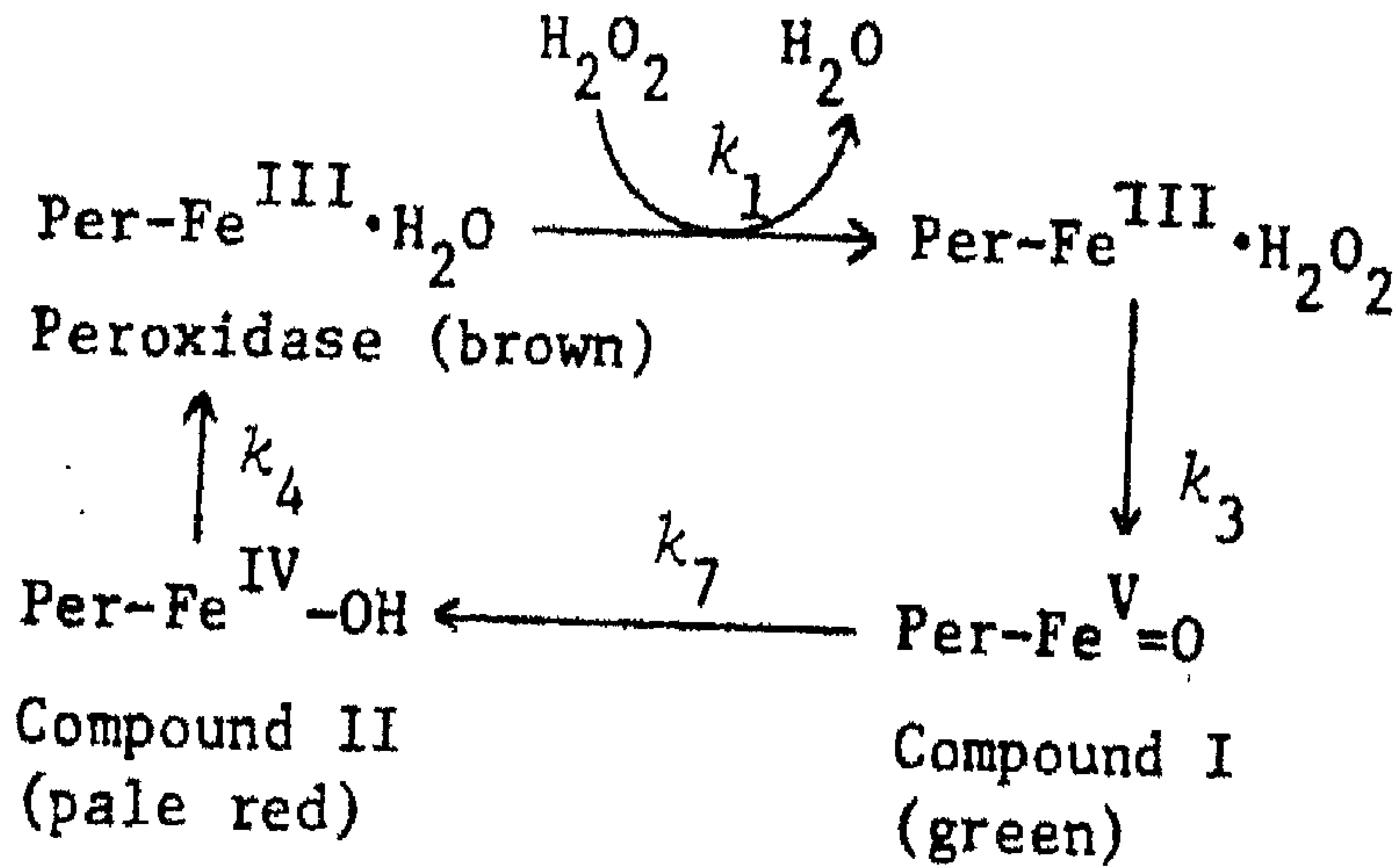
جدول (2-4) درجة النقاوة Rz لايزوأنزيمات بيروكسداز الفجل

$$Rz = \frac{\text{الإمتصاص عند 403 نانوميتر}}{\text{الإمتصاص عند 275 نانوميتر}}$$

Isozyme	Rz	Isozyme	Rz
A-1	4.19	C	3.42
A-2	4.12	D	2.57
A-3	3.71	E	2.50
B	3.37		

2-6-5-3 التغيرات الطيفية لأنزيم البيروكسداز الناتجة عن اتجاه بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)

أنزيم البيروكسيداز المنقى والمستخرج من الفجل ذو لون بني ويظهر طيفه عدة قمم امتصاص أعلاها Soret peak عند الطول الموجي 403 نانوميتر (معامل الانطفائية =1.085 × 10مول$^{-1}$ سم$^{-1}$) عند إضافة زيادة طفيفة من بيروكسيد الهيدروجين إلى أنزيم البيروكسداز وفي غياب مركب مانح للهيدروجين، يتكون آنيا مركب ذو لون اخضر لايلبث ان يتحول إلى مركب احمر شاحب وهذا بدوره يضمحل ببطء ليعطي اللون البني الاصلي كما في الشكل (2–20).



شكل (2-20) التغيرات الكيميائية الناتجة عن اتحاد أنزيم البيروكسداز ببيروكسيد الهيدروجين .

ان ثابت السرعة K_1 (شكل 2-20) لتكوين المركب I (Compound I) يساوي 9 × 10^6 مول$^{-1}$ ثانية$^{-1}$ في الرقم الهيدروجيني 4.6 ودرجة حرارة 25 °م وهذه قيمة عالية جدا إذا ما قورنت بقيمتي K_7 و K_4 (4.0 و0.02 ثانية$^{-1}$ على التوالي) في حين أن ثابت السرعة K_1 من قيمة K_3 لتكوين المركب ذي اللون الاخضر. يصاحب تكوين المركبات الوسطية المختلفة تغيرات طيفية .ان الامتصاص في منطقة السوريت Soret (عند 400 نانوميتر) اعلى بكثير منه عند الاطوال الموجية الاعلى، وعند تكوين المركب I ينخفض الامتصاص بشكل ملحوظ عند 403 و497 نانوميتر فيما يزداد عند الاطوال الموجبة الأعلى من 550 نانوميتر إذ تظهر قمة عريضة عند 575 نانوميتر وقمة أخرى عند 650 نانوميتر وهناك تغيرات طيفية اخرى مميزة لتكوين المركبات 11 و111 (شكل 2-19)

2-6-5-4 التفاعلات المحفزة بأنزيم البيروكسداز

يحفز أنزيم البيروكسداز اربعة انواع من التفاعلات

أ – تفاعلات البيراكسدة Peroxidatic Reactions

وهي أهم التفاعلات التي يحفزها الأنزيم عند اجراء التفاعل في الزجاج in vitro بوجود مركب فينولي ويحصل التفاعل عند استخدام R-Cresol أو Guaiacol أو Resorcinol أو An iline ... الخ بمثابة ركائز :

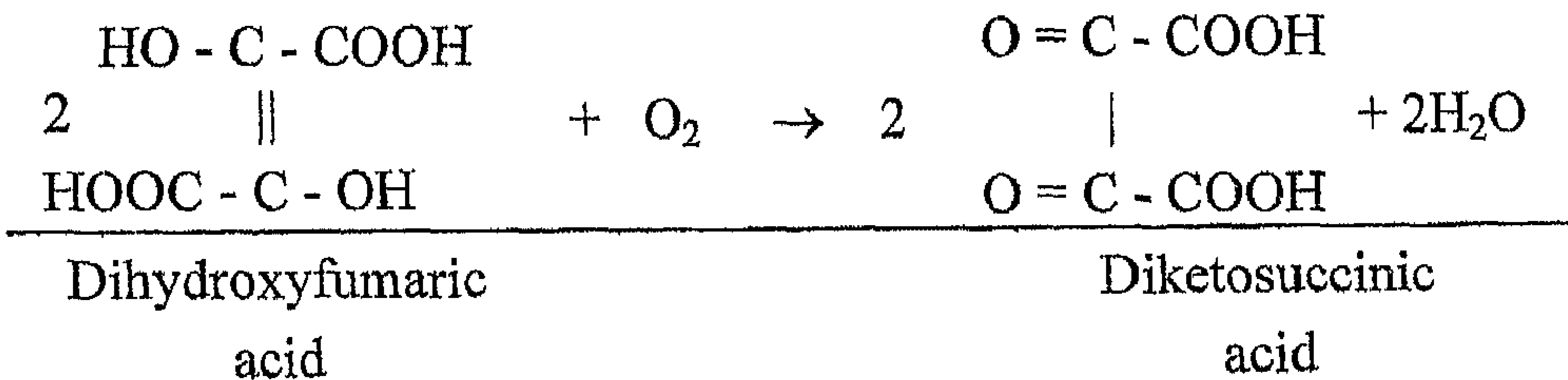


$$H_2O_2 + 2AH_2 \rightarrow 2H_2O + \text{polymerized products (HAAH)}$$

(22-2)

ب- تفاعلات الأكسدة Oxidatic Reactions

يحفز البيروكسداز تفاعلات الأكسدة بوجود الأوكسجين الجزيئي وعند توفر الركيزة الملائمة وكمثال Dihydroxy fumaric acid ، Ascorbic acid ، k Hydroquin one ... الخ .



$$2\begin{matrix} HO-C-COOH \\ \| \\ HOOC-C-OH \end{matrix} + O_2 \rightarrow 2\begin{matrix} O=C-COOH \\ | \\ O=C-COOH \end{matrix} + 2H_2O$$

Dihydroxyfumaric acid　　　Diketosuccinic acid

(23 -2)

ج- التفاعلات التحفيزية Catalatic reactions

عند غياب المادرة المانحة للبروتينات، يستطيع أنزيم البيروكسيداز تحويل بيروكسيد الهيدروجين الى H_2O وO_2 :

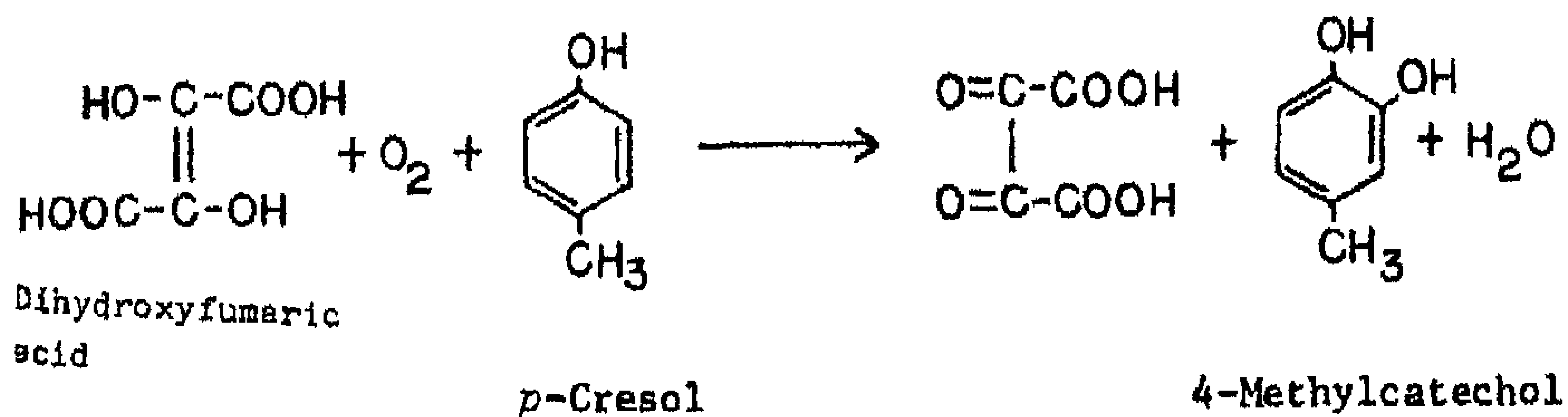


$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

الا ان التفاعل ابطأ بكثير (حوالي 100 مرة) من تفاعلات الأكسدة والبيرأكسدة .

د- تفاعلات الهدركسلة **Hydroxylation Reations**

عند وجود مركبات مانحة للهدروجين وخاصة Dihydroxyfumaric يمكن لأنزيم البيروكسداز أن يؤدي إلى هدركسلة Hydroxylation مجموعة من المركبات الأروماتية بوجود الأوكسجين الجزيئي، ومن هذه المركبات Phenylalan-ine Tyrosine، Benzoic acid، وحامض السالسلك Salicylic acid.



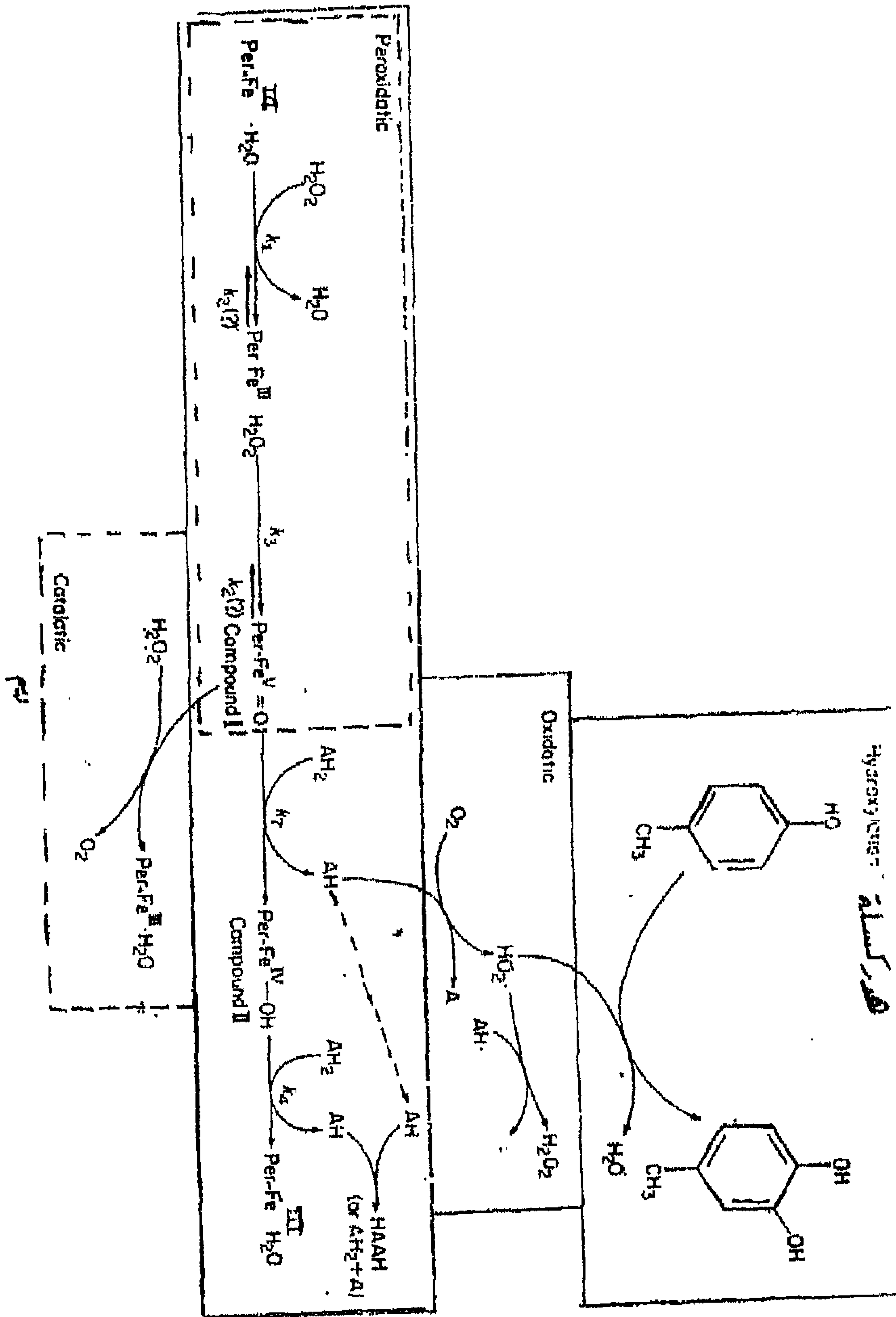
(25 -2)

2-6-5-5 آلية عمل أنزيم البيروكسداز

امكن استدلال على آلية عمل أنزيم البيروكسداز استناداً إلى نتائج التجارب العملية وافترضت الآلية التالية (شكل 2-21).

في الخطوة الأولى لتفاعل البيرأكسدة (شكل 2-21) تحل جزيئة H_2O_2 محل الماء في إحدى الاواصر التناسقية للحديد الموجود في البروتوهيمين لتكوين معقد الأنزيم – الركيزة ويكون التفاعل سريعا K_1 - 9×10^6 مول$^{-1}$ ثانية$^{-1}$) ومن الدرجة الثانية وينتج عنه تكوين معقد الأنزيم – الركيزة per- Fe^{III}. H_2O.

تمثل الخطوة الثانية للتفاعل تحول المعقد per- Fe^{III}. H_2O_2 إلى المركب – Fe^{V} =Cper O^{I}. إن ثابت السرعة K_3 للتفاعل أكبر من K_1 للخطوة الأولى وأكبر بكثير من ثابت السرعة K_2 لتحول المركب I إلى per-Fe^{III}. H_2O (شكل 2-21) والذي يقدر بحوالي 0.1-3 ثانية $^{-1}$.



شكل 2- 21 آلية عمل أنزيم البيروكسداز في الأنواع الأربعة من التفاعلات التي يحفزها

تتضمن الخطوة الثالثة البيرأكسدة تفاعل للمركب I مع مادة أخرى مانحة للهدروجين (AH_2) لتكوين المركب per- Fe^{iv}- OH II وجذر حر AH^0. إن سرعة التفاعل كبيرة ويكون ثابت السرعة (K_7) عادة أكبر بمقدار 40-100 مرة من ثابت السرعة للتفاعل التالي (K_4) ويعتمد ثابت السرعة على المادة المانحة للهدروجين.

وفي الخطوة الرابعة للتفاعل: تم تفاعل المركب II مع جزيئة ثانية AH_2 مانحة للهدروجين وبذلك يتحرر الأنزيم بصيغته الأصلية per- Fe^{III}, H_2O مع تكوين جذر حر آخر AH. يعتمد مول ثابت السرعة للتفاعل K_4 على طبيعة المادة المانحة للهدروجين، ويتراوح بين 8×10^7 مول$^{-1}$ ثانية$^{-1}$ للمركب p - Hydroxydiphenyl إلى 17 للنتريت Nitrite.

في التركيزات العالية لمعظم المواد المانحة للهدروجين (عدا عن Hydroxy p -diphenyl و O- phenylene diamine) تتحدد سرعة التفاعل بأكمله بالخطوة الرابعة التي يتم فيها تحول المركب II إلى أنزيم البيروكسداز.

على الرغم من إمكانية العديد من المركبات أن تعمل بمثابة مانحات للهدروجين إلا أنه فقط لبيروكسيد الهدروجين وبيروكسيد المثيل وبيروكسيد الاثيل أن تتفاعل مع البيروكسداز لتكوين المركب I ويقدر ثابت السرعة K_1 لهذه التفاعلات بـ 9×10^7 و1.5×10^6 و 3.6×10^6 مول$^{-1}$ ثانية$^{-1}$ للمركبات HOOH و CH_3OOH و CH_3CH_2COOH على التوالي.

عند غياب مادة مانحة للهدروجين، تكون سرعة تحول المركب I إلى II هي 4 ثانية $^{-1}$ وسرعة تحول المركب II إلى البيروكسداز 0.02 ثانية $^{-1}$ وتظهر الفعالية التحفيزية catalatic activity لأنزيم البيروكسداز (المعادلة 2-24) عند تفاعل جزيئة لبيروكسيد الهدروجين بصورة مباشرة مع المركب I لتكوين البيروكسداز و H_2O وO_2 (شكل 2-21)

يعتمد مصير الجذور الحرة AH الناتجة عن تفاعل البيرأكسدة على وجود O_2 وطبيعة المركبات الفينولية وكما يأتي:-

أ- إذا كان AH_2 المركب Guaiacol مثلاً، تتفاعل الجذور الحرة AH بعضها مع بعض لتعطي ناتجاً متبلمراً polymerized يرمز له HAAH كما في الشكل (2-21) ويمكن أن يعمل HAAH بمثابة مانح للهدروجين مؤدياً إلى درجة أعلى من البلمرة.

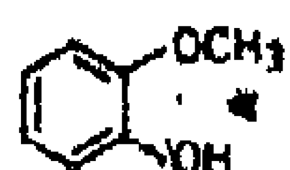
ب- إذا كان AH_2 متمثلاً بحامض الإسكوربيك أو Dihydroxy Fumaric تتفاعل الجذور الحرة مع بعضها لإعطاء جزيئة واحدة لكل من المركب المختزل AH_2 والمؤكسد A.

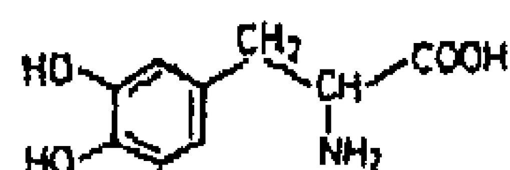
ج- يمكن أن يتفاعل الأوكسجين الجزيئي O_2 مع الجذر الحر لبعض المركبات المانحة للهدروجين وكمثال Dihydroxy Fumaric acid لإعطاء جزيئة من المانح المؤكسد وجذر HO_2، والتي تتفاعل بدورها مع جذر AH بغياب مركب اروماتي لإعطاء $A+ H_2O_2$ (انظر تفاعل الأكسدة شكل 2-21).

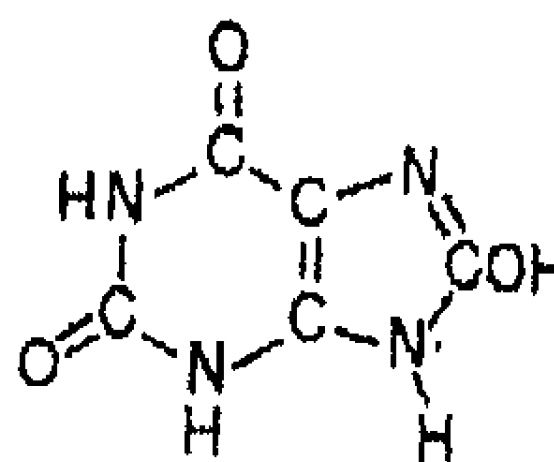
د- عند وجود بعض المركبات الأروماتية، يستطيع الجذر HO_2 هدركسلة Hydroxylation المركب (معادلة 2-25 وشكل 2-21 تفاعل الهدركسلة) وعلى هذا الأساس فإن فعالية الأكسدة والهدركلسلة للبيروكسداز لا تنتج عن الفعالية المباشرة للبيروكسداز وإنما تحصل من خلال تفاعلات ثانوية متسببة عن تكوين جذور HO_2 الحرة.

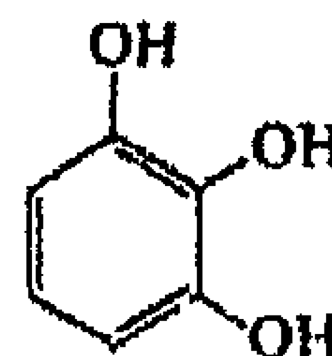
2-6-5-6 تقدير نشاط أنزيم البيروكسداز

تشمل الطرق المعتدة لتقدير نشاط الأنزيم على استخدام مركبات مانحة للهدروجين مثل Guaiacol و pyrogallol وسايتوكروم C وحامض اليورك و- Dihydroxyphen Ylalanine (شكل 2-22).





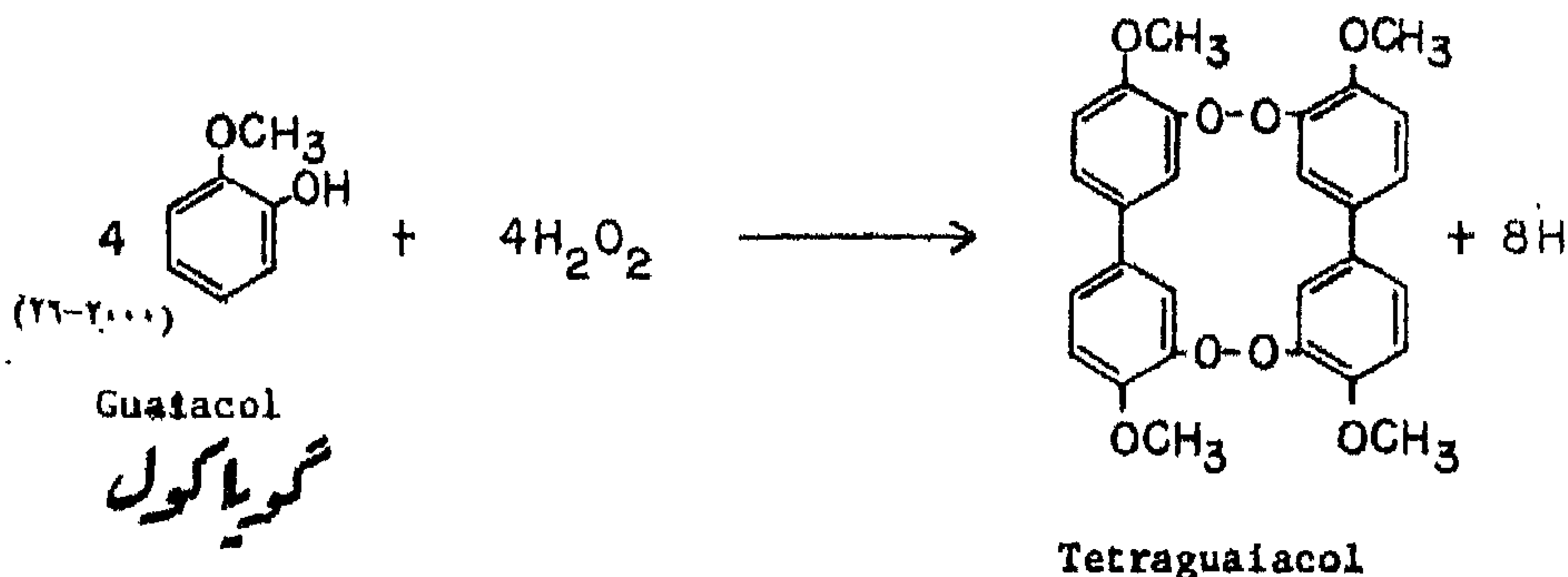




جوياكول 3,4-Dihydroxyphenylalanine Uric acid Pyrogallol

شكل 2- 22 تركيب بعض ركائز أنزيم البيروكسداز والمستخدمة كمانحات للهدروجين

إلا أن أكثر الطرق شيوعاً تلك المستخدمة للمركب Guaiacol وذلك لسهولتها. يضاف المركب Guaiacol و H_2O_2 إلى المحلول الداريء Buffer في الرقم الهدروجيني (7) ثم يضاف أنزيم البيروكسداز لبدء التفاعل وتقاس الزيادة في الإمتصاص مع الزمن عند الطول الموجي 470 نانوميتر. يمثل tetra guaiacol الناتج الرئيسي للتفاعل.



ويمكن حساب كمية H_2O_2 المستهلكة في التفاعل من معامل الإنطفائية المولاري Em للناتج tetra guaiacol (2.66×10^{4} مول$^{-1}$ سم$^{-1}$ عند 470 نانوميتر) والتغير في الإمتصاص.

2-6-5-7 أهمية البيروكسداز التكنولوجية

إن أنزيم البيروكسداز شديد المقاومة للحرارة ولذا يستعمل مؤشراً لكفاءة عملية السلق إذ يحتفظ بنصف فعاليته الأصلية عند معاملته بدرجة 85°م لمدة 32 دقيقة. وأن للأنزيم أهمية كبيرة في تقييم عمليات التصنيع الغذائي الأخرى المستخدمة للحرارة كالتجفيف والتعقيم وهكذا يدل كشف البيروكسداز السالب Negative peroxidase test على استخدام كمية من الحرارة كافية لإيقاف نشاط الأنزيمات الأخرى غير المرغوبة مثل polyphenol oxidase و Catalase و Lipoxygenases و Ascorbic acid oxidases و Lipases مما يضمن الإقلال من التغيرات غير المستساغة للأغذية كتغير اللون والنكهة (الطعم والرائحة) في أثناء التصنيع أو التخزين.

يلعب أنزيم البيروكسداز- إضافة إلى أنزيمات phenol oxidases دوراً مهماً في إنتاج المركبات الملونة والمواد النكهة عند اختمار كل من الشاي والتبغ. يكتسب التبغ لوناً بنياً نتيجة لتغيرات تأكسدية في الجزء الكربوهيدراتي Aglycone للمركب Rutin وأما صبغة الشاي الأسود، فإنها تنشأ من التانينات Tannins وكلا العمليتين ناتج عن نشاط الأنزيمين معاً: peroxidase و phenol oxidase.

2-6-6 الكاتالاز

Hydrogen peroxide: hydrogen peroxide Oxidoreductase. Ec. 1.11.1.6 (Catalase)

يوجد هذا الأنزيم في الحيوانات والنباتات والأحياء المجهرية ولقد أمكن تنقيته من جميع هذه المصادر. استطاع Samner و Dounce عام 1937 تحضير بلورات الكاتالاز من كبد الأبقار وتبعهما آخرون في بلورته من مصادر مختلفة.

2-6-6-1 البروتين والمجموعة الضميمة protein and prosthetic Group

تمتلك أنزيمات الكاتالاز وزنا جزيئيا يقارب 240.000 وتحوي أربع مجاميع بروتوهيمين لكل جزيئة أنزيمية تتكون الجزيئة من أربع دون وحدات Subunits تحتوي كل منها على مجموعة بروتوهيمين واحدة. ويظهر بأن كلا من المواقع النشطة الأربعة ، للأنزيم تعمل بمعزل عن الأخرى يظهر طيف الكاتالاز قمة امتصاص عند 406 نانوميتر نظرا لوجود مجموعة Ferriprotoporphyrin III (شكل 2-18) ويكون

$$\frac{\text{الامتصاص عند 280 نانوميتر}}{\text{الامتصاص عند 406 نانوميتر}}$$ مقاربا إلى واحد لجميع أنزيمات

الكاتالاز التي تم دراستها.

بالنظر لتكوين أنزيم الكاتالاز من دون وحدات فإنه لايقاوم الحرارة وبذلك يختلف عن البيروكسداز. يفقد أنزيم الكاتالاز نشاطه بسرعة في 35°م في حين يكون البيروكسداز مستقرا في 65-70°م في الرقم الهيدروجيني المقارب إلى (7). وأن الأنزيم أقل استقراراً في الأوساط القاعدية ذات الرقم الهيدروجيني الأعلى من (9) وذلك بسبب تفارق Dissociation دون وحداته.

لا يرتبط البروتوهيمين إلى الجزء البروتيني بآصرة تساهمية ولهذا يمكن إزالته بمعاملة الأنزيم بالاستون الحامضي، ويمكن ملاحظة الأهمية المتبادلة للمجموعة الضميمة والبروتين من السرع النسبية لتحلل بيروكسيد الهدروجين بوجود وبغياب الأنزيم. إن رقم التحول Turnover number للتفاعل الأنزيمي 9×10^4 (بوجود 10^{-2} مولار H_2O_2) وللتفاعل غير الأنزيمي 00.05 أو 22.7 بوجود hemin phosphate وأملاح الحديديك والمعقد المخلبي chelate للحديد مع Triethylene tetramine على التوالي.

2-6-6-2 التفاعلات المحفزة بأنزيم الكاتالاز

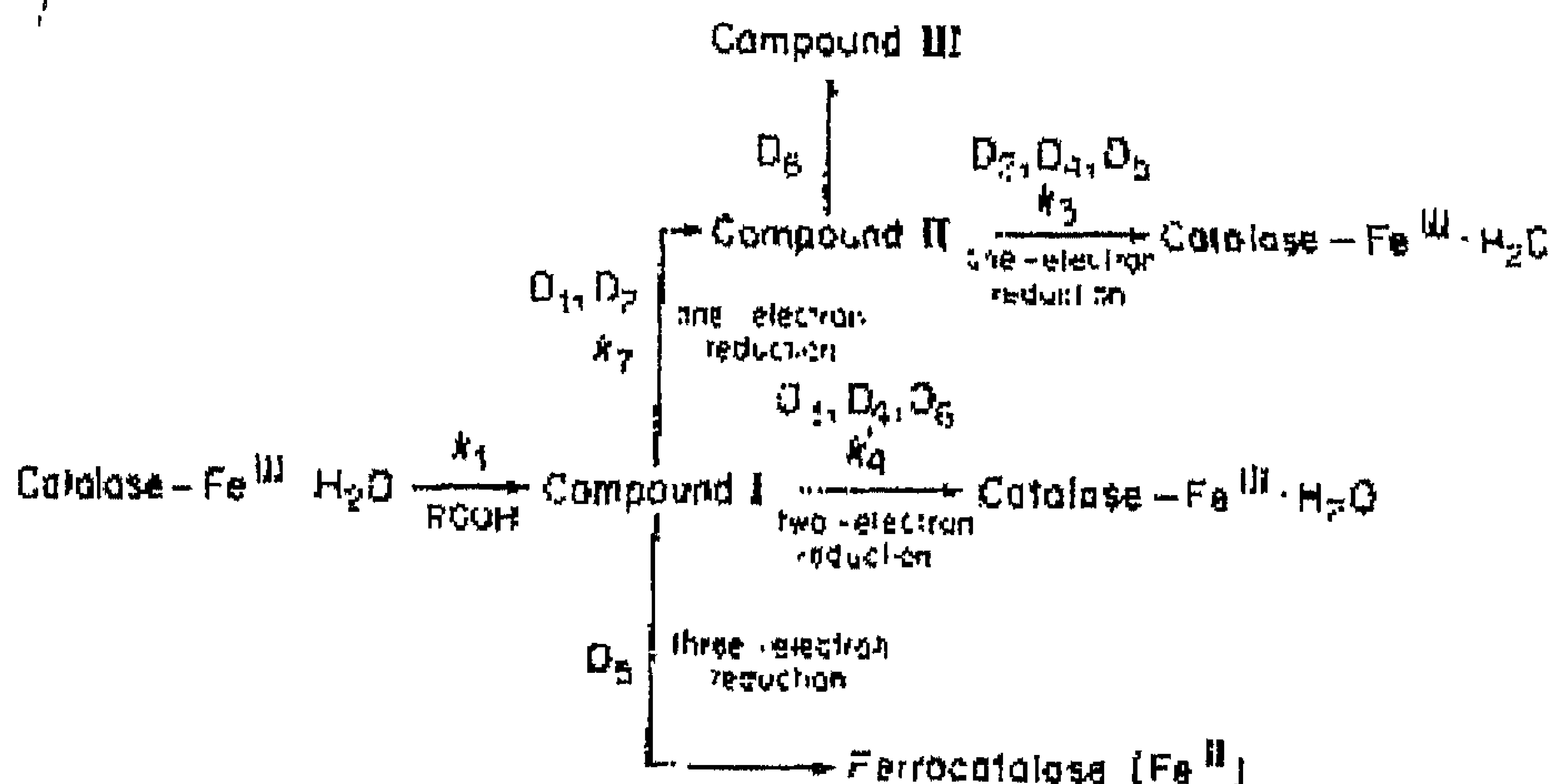
يحفز الكاتالاز نوعين من التفاعلات peroxidatic وCatalatic (المعادلتان 2-22 و2-24). يظهر التفاعل التحفيزي Catalatic عند تقدير نشاط الأنزيم في الظروف الإعتيادية أما تفاعل البيرأكسدة فإنه يحصل عند وجود تركيزات واطئة جدا من البيروكسيد وبوجود مانحات الهدروجين مثل الميثانول والإيثانول والفينولات.

2-6-3 التغيرات الطيفية لأنزيم الكاتالاز والناتجة عن ارتباطه بالبيروكسيدات

عند إضافة تركيزات واطئة من بيروكسيد الهدروجين إلى أنزيم الكاتالاز، تتكون مركبات مختلفة طيفيا مشابهة إلى حد كبيرالمركب I للبيروكسداز شكل (2-19) كما يتكون المركب II بتركيزات واطئة. وعند وجود الكاتالاز مع بيروكسيد الاثيل Ethy peroxide يتكون تركيزات عالية من المركب II أما المركب III (احمر ساطع) (انظر شكل 2-19) فأنه لا يتكون عند وجود بيروكسيد المثيل أو الاثيل ولكنه يتكون عند وجود تركيزات عالية من بيروكسيد الهيدروجين إضافة إلى أحد مركبات البيروكسيد هذه ويعتقد بأن المركب III لا يلعب دوراً مباشرا في نشاط أنزيم الكاتالاز.

2-6-6-4 مانحات الهدروجين لأنزيم الكاتالاز وآلية التفاعل:

تمثل بيروكسيدات الهيدروجين والمثيل والاثيل (HOOHو CH_3OOH و CH_3CH_2OOH) الركائز الأساسية لأنزيم الكاتالاز في حين تعمل العديد من المركبات الأخرى بمثابة مانحات الهدروجين (شكل 2-23). سوف نتناول المجاميع المانحة (D و Donors) الآتية: الفينولات D_2، الكحولات D_3 وبيروكسيد الهيدروجين D_6.



شكل 2- 23 تفاعلات انزيم الكاتالاز مع مانحات الهدورجين، تشير الحروف **D** إلى المانحات حيث أن D_1: **Ascorbate** أو D_2: **Ferrocyanide** فينولات، D_3: كحولات أو حامض الفورمك D_4 **:Formic** نتريت D_5 **:Azide** أو D_6 **Hydrox-Ylamine** بيروكسيد الهدروجين.

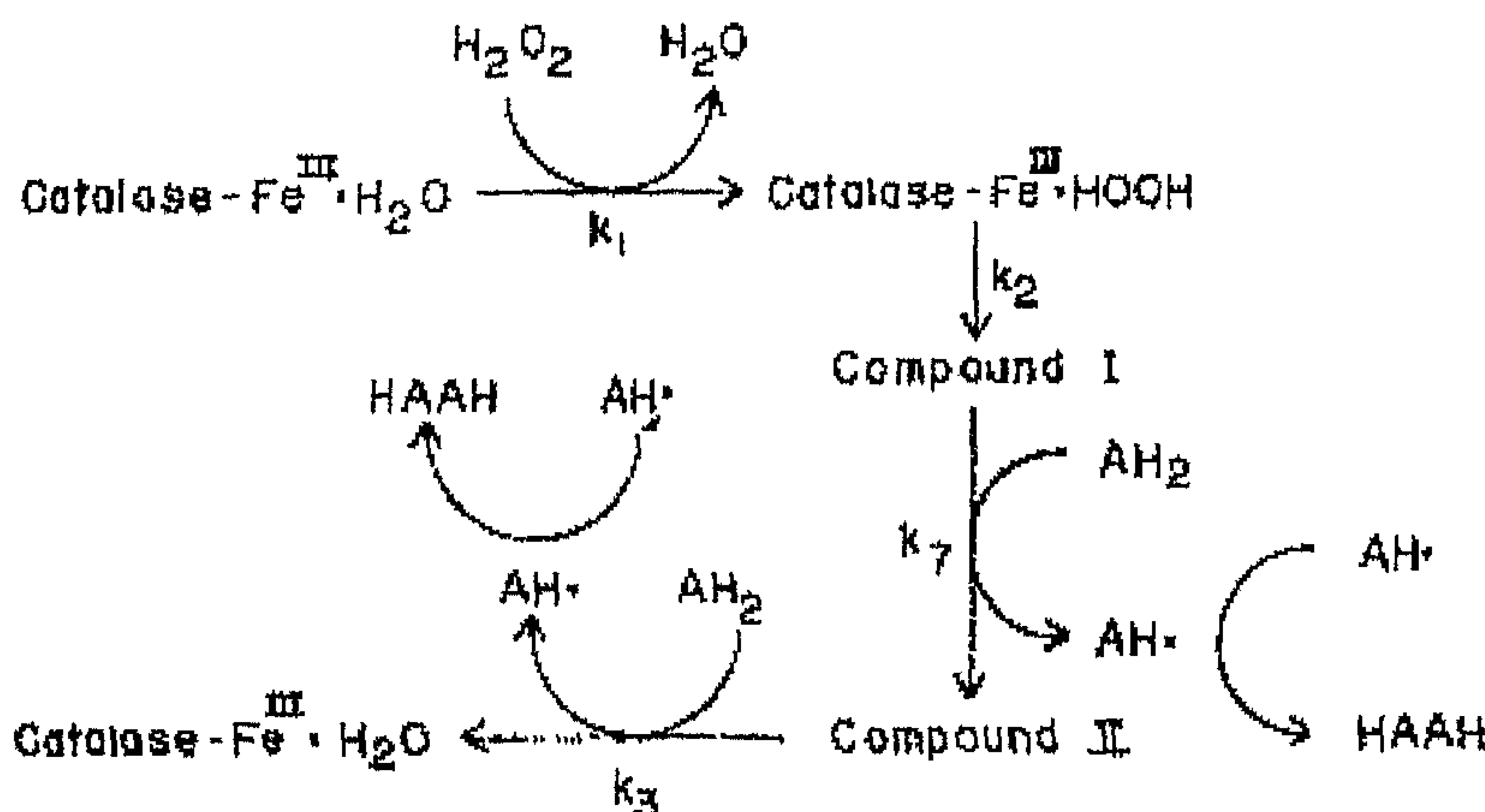
يقدر ثابت السرعة k_1 لتكوين المركب I بالقيم 9×10^6 و 8.5×10^0 و 2×10^4 مول$^{-1}$ ثانية$^{-1}$ للركائز HOOH و CH_3OOH وCH_3CH_2OOH على التوالي في الرقم الهدروجيني 7 ودرجة حرارة 25°م. إن ثابت السرعة K_1 من الدرجة الثانية مما يشير إلى تكوين معقد الأنزيم- الركيزة الذي يتفاعل بدوره لتكوين المركب I وكما ذكرنا سابقا , فإن قيمة K_1 للكاتالاز وبيروكسيد الهدروجين HOOH(6×10^6 مول$^{-1}$ ثانية $^{-1}$) تقارب قيمته للبيروكسيداز والركيزة ذاتها HOOH (9×10^6 مول$^{-1}$ ثانية$^{-1}$) إلا أن قيمة K_1 للكاتالاز أكثر إعتمادا على طبيعة البيروكسيد مما هي عليه للبيروكسداز فهي 2×10^4 مقابل 3.6×10^6 مول$^{-1}$ ثانية$^{-1}$ للكاتالاز والبيروكسداز على التوالي وبوجود CH_3CH_2OOH.

عندما يكون HOOH مانحاً للهدروجين catalatic reaction فإن التفاعل يتجه مباشرة من المركب I لإنتاج الماء و O_2 ويتحرر الأنزيم ,Catalase-Fe ^{III}

H_2O (شكل 2- 23). يكون ثابت السرعة K_4 لهذا التفاعل ثلاثة أضعاف K_1 ويساوي 1.8×10^7 مول $^{-1}$ ثانية $^{-1}$ لبيروكسيد الهدروجين. يتضح إذن بأن كلا الخطوتين K_1 k_4 محددة لسرعة تحلل HOOH المحفز بالكاتالاز.

عندما يجري التفاعل في تراكيز واطئة لبيروكسيد الهدروجين (حوالي 10^{-9} مولار) وبوجود الكحولات مثل الميثانول والايثانول يتم أكسدة الكحول إلى الالدهيد (CO_2، H_2O في حالة الميثانول) والآلية نفسها التي يتم بها عندما يكون HOOH مانحاً للهدروجين إلا أن $K_4 = 1 \times 10^3$ مول$^{-1}$ ثانية$^{-1}$ للميثانول والايثانول و 9×10^0 مول$^{-1}$ ثانية$^{-1}$ لحامض الفورميك.

عند إضافة بيروكسيد الهدروجين وأنزيم الكاتالاز إلى محلول حاو على مركبات أروماتية معينة مثل pyrogallol و p-Cresol فإن هذه المركبات تتاكسد إلى نواتج ملونة. وتحصل هذه التفاعلات بأسلوب مشابه لتلك المحفزة بالبيروكسيداز (شكل 2-24) يساوي ثابت السرعة K_3 لتحول المركب II إلى الأنزيم H_2O، Catalase-Fe 80 و 8 مول$^{-1}$ ثانية $^{-1}$ للبايروكالول pyrogallol و p-Cresol على التوالي بينما تقارب k_2 (التحول المركب I إلى المركب II) 240 و 24 مول$^{-1}$ ثانية$^{-1}$ على التوالي. إن هذه السرعات أقل بحوالي 4×10^4 مرة مما هي عليه لتفاعلات أنزيم البيروكسيداز وهذا يدل على أن كفاءة أنزيم الكاتالاز في تحفيز تفاعلات البيرأكسدة واطئة إذا ما قورن بالبيروكسيداز والعكس صحيح تماماً فيما يحض تفاعلات التحفيز Catalatic.



شكل (2- 24) تفاعلات أنزيم الكاتالاز بوجود بيروكسيد الهدروجين وبعض المركبات الأروماتية مثل بايروكالول أو **P-Cresol** (انظر الجدول 2- 2).

2-6-6-5 الأهمية التكنولوجية لأنزيم الكاتالاز

يوجد أنزيم الكاتالاز في جميع الخلايا القادرة على التنفس الهوائي ومصادره الصناعية هي الكبد وبعض أنواع البكتريا مثل Micrococcu Lysodeikticus، Penicillium Chrysogenum والأعفان Aspergillus niger يمتلك الأنزيم المستخرج من البكتريا M. Lysodeikticus رقم تحول يساوي 107 وهو من أنشط الأنزيمات المعروفة.

تكون أنزيمات الكاتالاز المستخرجة من الأعفان جديرة بالملاحظة لأنها أقل تأثراً بالحرارة وبتغير الرقم الهيدروجيني وبالتركيزات العالية لبيروكسيد الهدروجين. إذا ما قورنت بالأنزيم المستخلص من مصادر آخرى. وقد يعزى السبب في ذلك إلى قلة الوزن الجزيئي (15000) مقارنة بأنزيم الكبد (250000) حيث أن تأثير التمسخ في الجزيئات الكبيرة يكون أكثر مما هو عليه في الجزيئات الصغيرة.

يستخدم الكاتالاز في الصناعة (مع أوكسداز الكلوكوز) لإزالة O_2 و H_2O_2 من الأغذية المصنعة. ويستعمل الكاتالاز المستخرج من الأعفان أو الكبد للتخلص من بيروكسيد الهدروجين المضاف بوصفه مادة حافظة ضد الأحياء المجهرية فمثلا يستخدم للحليب المجهز لإنتاج الجبن كما يمكن بواسطته التخلص من الكمية الزائدة لبيروكسيد الهدروجين بعد إستعمال الأخير مادة قاصرة للألوان.

2-6-7 الأنزيم Lipoxygenase

ويسمى أيضاً أوكسداز الشحوم Lipoxidase إسمه النظامي: Linoleate: Oxygen Oxidoreductase: E C.1.13.1.11.12

ويحفز التفاعل الآتي:

حامض دهني غير مشبع + أوكسجين ← بيروكسيد الحامض الدهني غير المشبع ... (2-27)

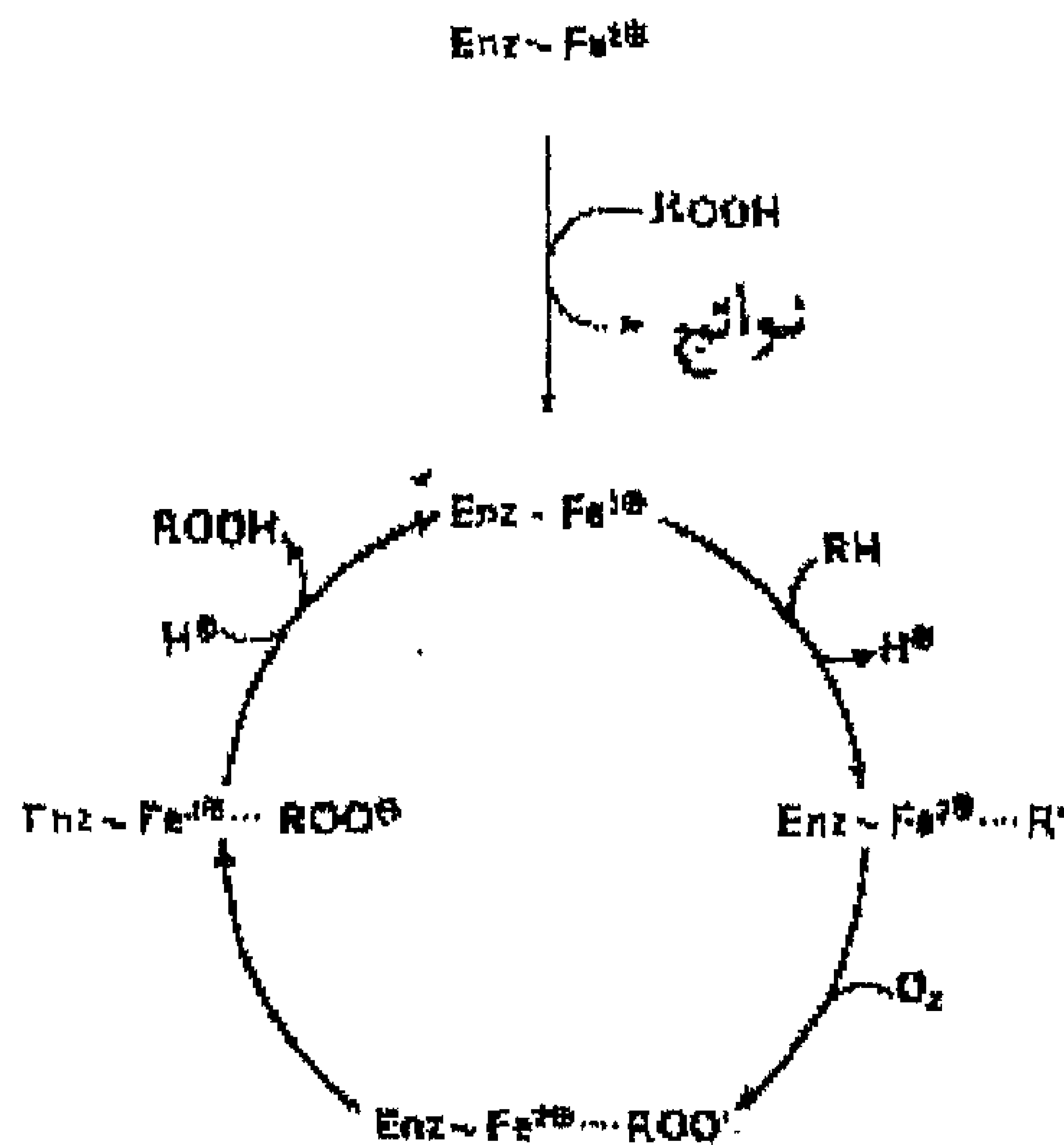
إكتشف هذا الأنزيم عام 1928 حيث سجل العالمان Bohn وHaas وجود أنزيم محلل للكاروتين Cartotene Oxidase في فول الصويا Soy bean وفي سنة 1932 قدم تقرير آخر يوضح إحتواء فول الصويا على أنزيم يسمى lipoxidase يؤكسد الدهون غير المشبعة. وأصبح واضحاً عام 1943 بأن الأنزيمين Carotene Oxidase وLipoxygenase هما أنزيم واحد ومع هذا فلقد أشارت المعلومات اللاحقة إلى أن الأنزيم Lipoxygenase النقي نشاطاً تحفيزياً أضعف منه للأنزيم غير النقي عند أكسدة الكاروتين مما دعا إلى احتمال وجود أنزيم ثان مؤكسد للكاروتين.

يوجد الأنزيم المؤكسج للشحوم Lipoxygenase في عدد كبير من النباتات وخاصة في البقوليات Legumes كما يوجد في البازاليا والفول السوداني والفاصوليا واللوبيا والفجل والبطاطا.

2-6-7-1 خصوصية التحفيز الأنزيمي Specificity of Lipoxygenase وآليته :

يتخصص الأنزيم المؤكسج للشحوم Lipoxygenase بأكسدة الأحماض الدهنية والدهون التي تحتوي على وحدة Cis, cis penta -1.4-diene ($-CH= CH-CH_2-CH= CH-$) مثل حامض اللنوليك Linoleic واللنولنك Linolenic والإراكدونك Arachidonic إذ تحتوي جميعاً على واحدة أو أكثر من هذه الوحدات.

يعد الأنزيم Lipoxygenase من البروتينات المعدنية Metaloprotein إذ يحتوي الموقع النشط على أيون الحديد. ينشط الأنزيم بناتج التفاعل الذي يحفزه وبواسطته يتأكسد Fe+2 إلى Fe+3 كما في الشكل (2-25) ويمكن توضيح آلية التفاعل كالآتي:

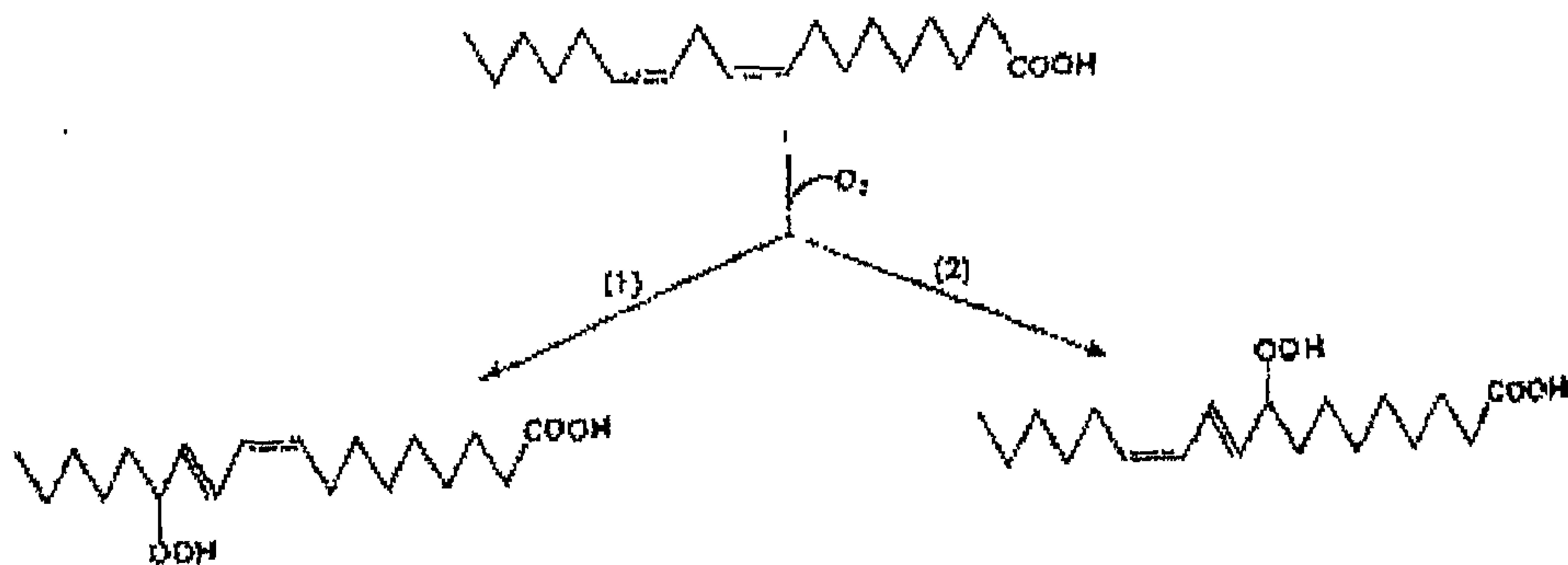


شكل 2- 25: آلية التحفيز بالأنزيم المؤكسج للشحوم Lipoxygenase يرمز RH للحامض الدهني Linoleic وRooH لهيدروبيروكسيد الحامض الدهني

يتفاعل الأنزيم $Enz \sim Fe^{+3}$ مع الحامض الدهني RH مؤدياً إلى فقدان ذرة هدروجين من مجموعة المثيلين لوحدة 1.4-penta diene تتأكسد ذرة الهدروجين إلى بروتون وينتج من التفاعل الجذر الحر R الذي يشكل معقداً مع الأنزيم Enz Fe^{+2} ---R يتفاعل المعقد المذكور مع الأوكسجين لتكوين $Enz- Fe^{+4}$---Roo أي معقد (جذر البيروكسيد- الأنزيم) ويختزل جذر البيروكسيد من قبل الأنزيمم ليتكون المعقد Fe^{+3}- Roo- Enz. وأخيراً يرتبط المعقد الناتج مع بروتون ليتحرر البيروكسيد ROOH والأنزيم. $Enz- Fe^{+3}$

هناك نوعان من الأنزيمات المؤكسجة للشحوم في النباتات:

أ- Lipoxygenase-1: ويعمل على الأحماض الدهنية الحرة غير المشبعة والحاوية على وحدة Cis- Cis- 1.4- penta diene ويحولها بدرجة عالية من التخصص الفراغي sterio- specificity إلى البيروكسيد ويتكون بذلك هدروبيروكسيد Hydroperoxide يحوي على وحدة Cis, trans-diene ويكون فعالاً بصرياً كما في الشكل (2-26).



شكل (2- 26)خصوصية الانزيم Lipoxygenase-I تجاه الركيزة Linolecic
(1) الانزيم المستخرج من فول الصويا (2) الانزيم المستخرج من الطماطا.

يستطيع Lipoxygenase-I أن يحول حامض اللنوليك إلى β-Hdropcroxide أو إلى O-Hydroperoxide (انظر الجدول 2-4 والشكل 2-26).

ب- Lipoxygenase-II: تعمل هذه الأنزيمات على أنها عوامل محفزة للتأكسد الذاتي Autoxidation إذ تعمل بتخصص واطيء في تحويل الحامض الدهني Linoleic إلى نوعين من الهدروبيروكسيدات المعروفة- والناتجة من التأكسد الذاتي- (جدول 2-5) وإلى نواتج تأكسدية أخرى مثل Oxodiene fatty acids إضافة إلى ذلك فإن هذه الأنزيمات تعمل على الأحماض الدهنية المؤسترة دون الحاجة للفعل المسبق لأنزيم الليباز Lipase.

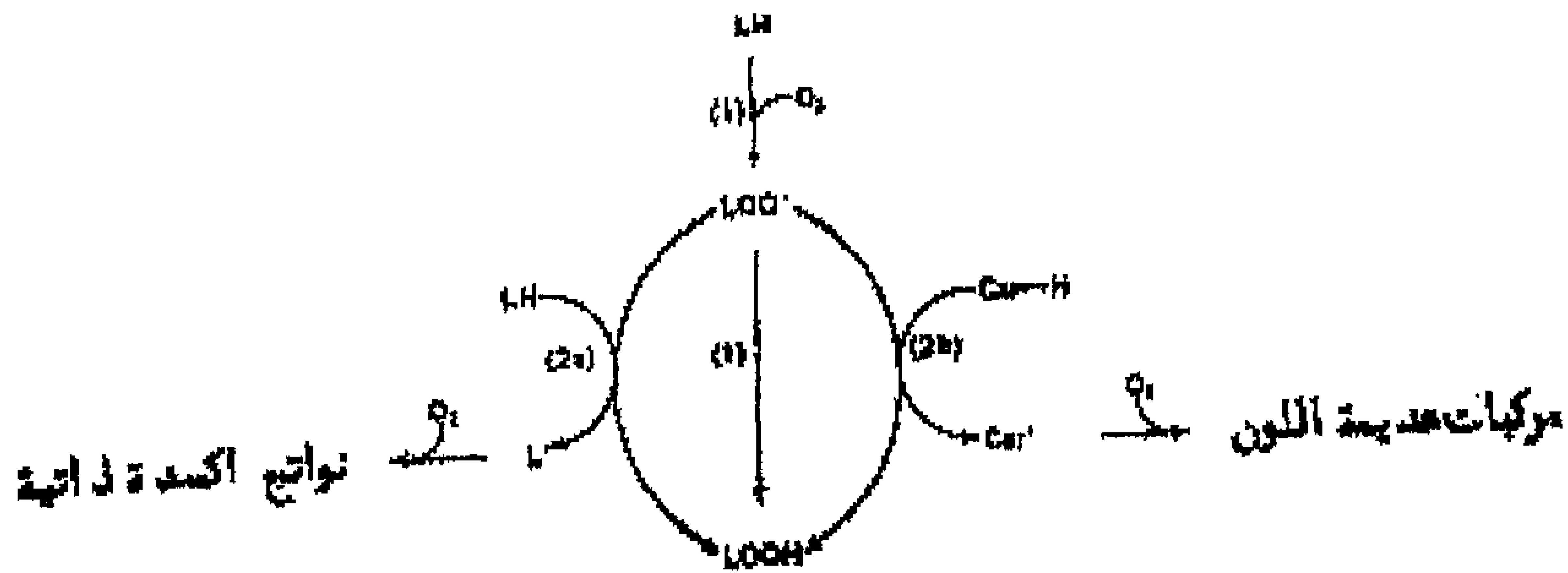
يستطيع Lipoxygenase-II أن يساهم في أكسدة الكلوروفيل والكاروتينات ويحولها إلى مركبات عديمة اللون وتستغل هذه الخاصية الأنزيمية لقصر لون الطحين.

جدول 2-5: مصادر الأنزيمات المؤكسجة للشحوم Lipoxygenases وبعض صفاتها.

الأغذية	نوع الأنزيم	الرقم الهدروجيني الأمثل	خصوصية الأكسدة	
			13 (٪) - RooH	9- RooH (%)
فول الصويا	I	-.9	95	5
فول الصويا	II	6.5	50	50
البازلاء	II	6.5	50	50
الفول السوداني	I	6.0	100	صفر
البطاطا	I	5.5	5	95

الأغذية	نوع الهدروجيني	الرقم الهدروجيني الأمثل	خصوصية الأكسدة	
			RooH (%)-9	RooH (%)-
الطماطة	I	5.5	5	95
الحنطة	I	6.0	10	90
الخيار		5.5	25	75
التفاح		6.0	90	10
التوت الأرضي		6.5	77	23
كزبرة	II	6.5	55	45

إن قابلية الأنزيمات Lipoxygenase-II على الإسهام في أكسدة هذه المواد يعود إلى أن الجذورالحرة الأولية للبيروكسيد لا تتحول بسرعة إلى الهدروبيروكسيد (التفاعل 1 شكل 2-27) كما هي الحالة مع أنزيمات النوع الأول Lipoxygenase وإنما يستطيع البعض سلب ذرات هدروجين من الأحماض الدهنية غير المشبعة الموجودة (التفاعل a2 شكل 2-27) أو من مركبات حاوية على عدد من الأواصر المزدوجة Polyene مثل الكاروتين كما في التفاعل b2 (شكل 2-27) وبذلك تمهد إلى التأكسد الذاتي لهذه المركبات.



شكل (2- 27) تفاعلات الانزيم **Lipoxygenase- II**

(1) المسلك الرئيس للتحفيز

(2a) و (2d) يرمزان إلى الخطوة التي تساهم فيها جذور البيروكسيد بعملية الأكسدة Cooxideation

Linoleic acid =LH (حامض اللنوليك)

Carotenoid = Car – H (كاروتينويد)

LOOH = هدروبيروكسيد حامض اللنوليك

Hydroperoxide of Linoleic acid)

مركبات عديمة اللون. نواتج أكسدة ذاتية

2-6-7-3 الأهمية التكنولوجية للأنزيمات المؤكسجة للشحوم

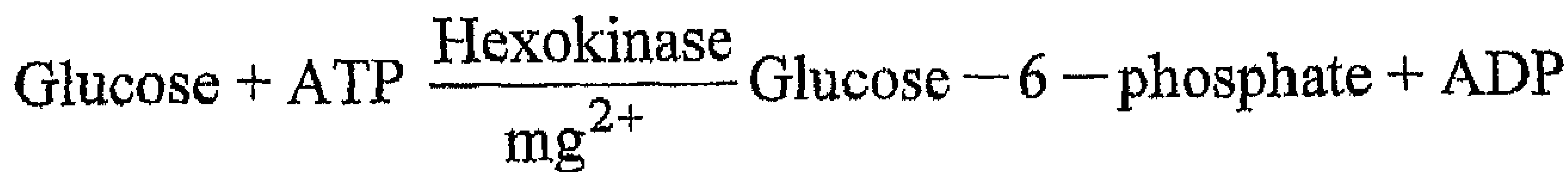
تعزى المرارة الحاصلة في منتوج الشوفان إلى فعالية الأنزيم Lipoxygenase ذلك أن نشاط الأنزيم Lipase يؤدي إلى تحرير الأحماض الدهنية لنوليك ولنولنك وهذه تتحول فيما بعد نتيجة لفعالية الأنزيم Lipoxygenase إلى البيروكسيدات ومن ثم وبطريقة كيميائية صرفه إلى مركبات أخرى تكسب المنتوج طعما مرا. يعمل الأنزيم المؤكسج للشحوم كذلك على ثلاثيات اسيل الكلسيرول Triacyl glycerol ولكن بسرعة أقل جدا منها عند أكسدة الأحماض الدهنية.

وهـذا يـدل علـى أن نـشاط أنـزيم الليبـاز يعجـل في الأكـسدة المحفـزة بـالأنزيم Lipoxygenase إلى حد كبير.

يفضل عند إنتاج المعجنات استعمال أصناف الحنطة الحاوية على نسبة عالية من الكاروتينات لتكوينها وبذلك لا تحتاج هذه المعجنات إلى التلوين بوصفه خطوة إضافية. إلا أن وجود الأنزيم Lipoxygenase يمكن أن يؤدي إلى تكوين البيروكسيدات التي تهدم الكاروتينات نتيجة لعملية التأكسد وبذلك يفقد المنتوج لونه في أثناء خطوات التصنيع أوالخزن ولهذا فمن المستحب أن تحتوي المادة الخام على نسبة عالية من الكاروتينات ونسبة واطئة من الأنزيم Lipoxygenase ولقد أمكن في السنوات الأخيرة إنتاج صنفين من الحنطة Durum في كندا يحمل هذه المواصفات.

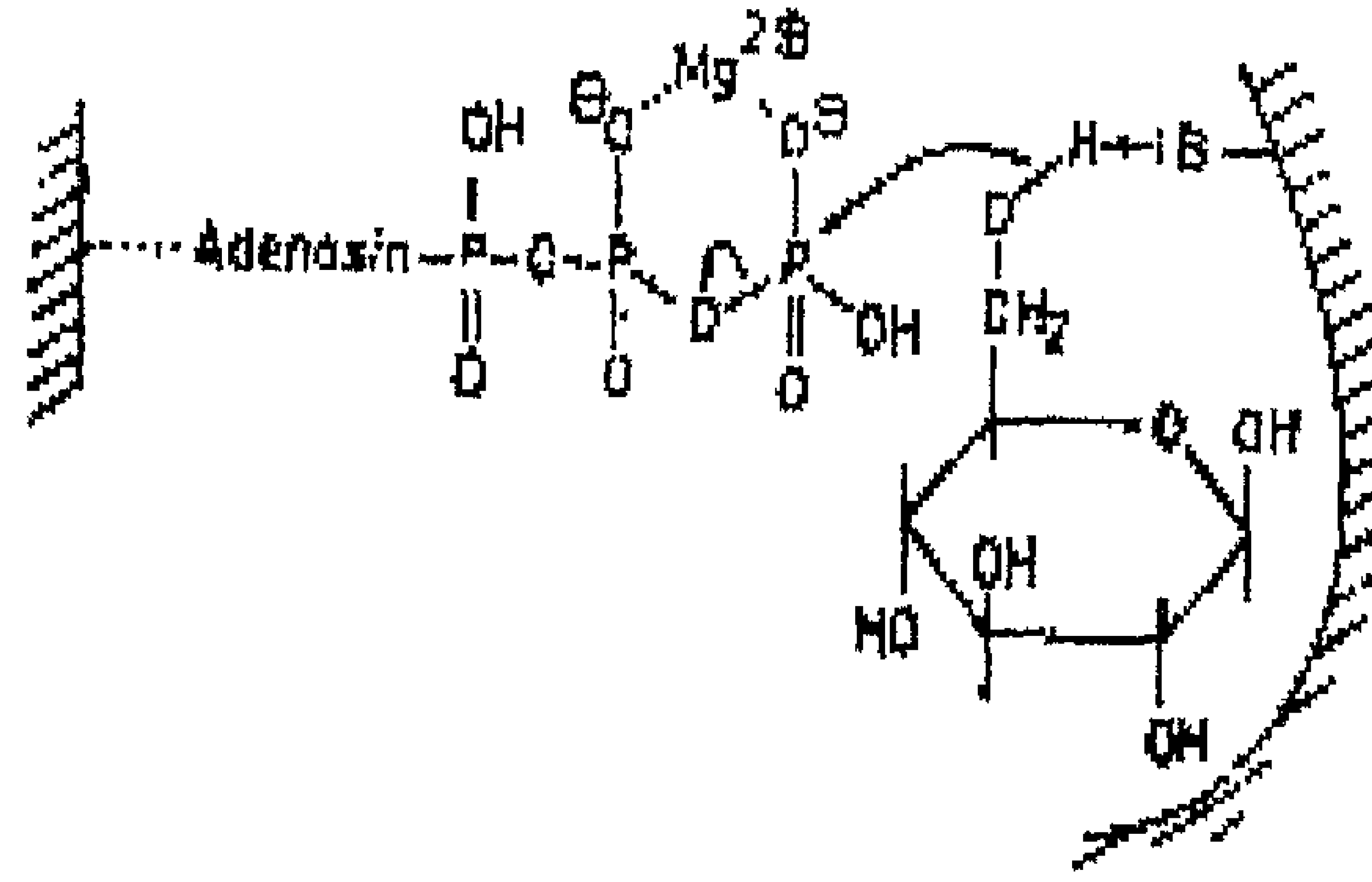
7-2 الأنزيمات الناقلة Transferases

تعمل على نقل مجاميع (لا تتضمن H) مثل مجموعة المثيل (CH_3) ومجموعة الاسيل Acyl ومجموعة الكلايكوسيل ومجموعة الامين ومجموعة الفسفات إلى جزيئات أخرى (غير الماء). وكمثال نقل مجموعة الفسفات من الـ ATP إلى الكلوكوز يتحفيز الأنزيم الناقل لهذه المجموعة والمسمى Hexo Kinase:



$$\text{Glucose} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{mg}^{2+}]{\text{Hexokinase}} \text{Glucose} - 6 - \text{phosphate} + \text{ADP}$$

(28-2)

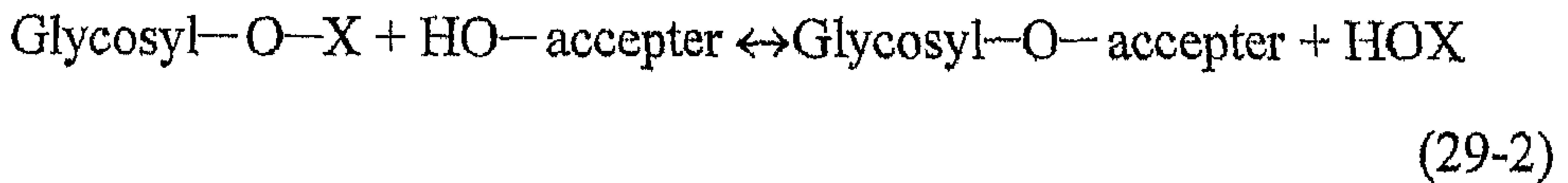


شكل (2- 28) تأثير Mg^{2+} في معقد الأنزيم - الركيزة

يعمل أيون المغنيسيوم المحب للكترونات بمثابة حامض لويس Lewis acid إذ يستقطب الاصرة- P -O لمجموعة الفسفات العائدة للركيزة ATP وبذلك يسهل هجوم ROH المحب للنواة Nucleophile على P—O كما في موضح في الشكل (2-28).

2-7-1 الأنزيمات الناقلة للكليكوسيل Glucosyl transferases, Ec. 2.4

يمكن تمثيل التفاعل الإجمالي للتخليق الحيوي لثنائيات السكريد وقليلات السكريد وعديدات السكريد بالمعادلة التالية (2-29).

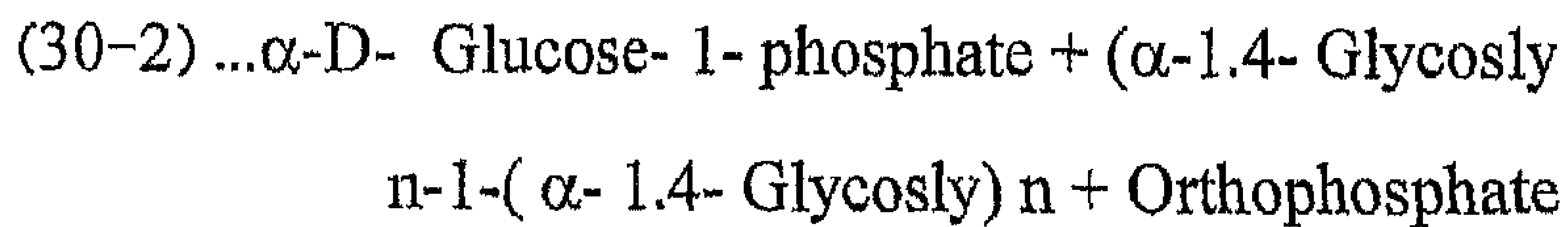


Glycosyl—O—X + HO—accepter ↔Glycosyl—O—accepter + HOX

(29-2)

وتحدد طبيعة الجزء (X) الطرق الثلاث لتكاثف السكريات:

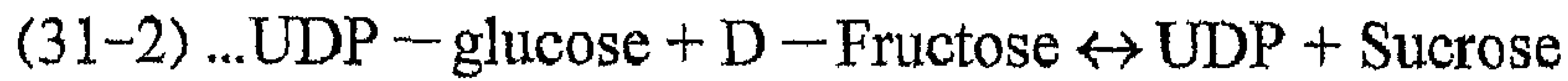
أ- إذا كانت (X) مجموعة فسفات كما في Aldose-1- phosphate سمي الأنزيم الناقل Phosphorylase كما في التفاعل الآتي:



(30-2) ...α-D- Glucose- 1- phosphate + (α-1.4- Glycosly

n-1-(α- 1.4- Glycosly) n + Orthophosphate

ب- إذا كان (x) pyrophosphate Nucleoside كما في المركبات Nucleoside diphosphate glycosides سمي الأنزيم الناقل Nucleoside diphosphate transglycosylase كما في الأنزيم المحفز لتخليق السكروز Sucrose-UDP glycosyltransferase:



(31-2) ...UDP − glucose + D − Fructose ↔ UDP + Sucrose

ج- إذا كان الجزء (x) سكريدات أحادية، ثنائية، قليلة أو عديدة الوحدات سمي الأنزيم Transglycosylase وكمثال Amylosucrase و Dextransucrase و Levansucrase (جدول 2-6) التي تؤدي إلى تكوين اميلوديكسترين Amylodextrin وديكستران Dextran وليفان Levan على التوالي:

جدول 2-6 تكوين عديدات السكريد عن طريق نقل جزء الكليوكوسيل

المواهب **Donor**	المستقبل **Acceptor**	البوليمر **polymer**	نواتج أخرى **Other product**	الأنزيم **Enzme**
Sucrose سكروز	(Glucose)n	Amylodextrin (1-4)	D- Fructose دي- فركتوز	Amyosucrase (α-1, 4-glucan: D-Fructose glucosyl transferase, -2 Ec 2.4. 1.4
Sucrose سكروز	(Glucose)N	Dextran (1-6)	D- Fructose دي- فركتوز	Dext ransucrase (α-1.6- glucan: D-fructose glucosyl transferase, -2 Ec 2.4.1.5

المواهب Donor	المستقبل Acceptor	البوليمر polymer	نواتج أخرى Other product	الأنزيم Enzme
Sucrose سكروز	(Fructose)N	Levan	D-Glucose دي كلوكوز	Levansurase (β-2,6- Fructan: D glucose fructosly transferase, -6 Ec 2.4.1.10)
Maltose مالتوز	(Glucose)N	Amlodextrin (1-4)	D-Clucose دي-كلوكوز	Amylomaltase (α- 1,4- glucan: 4- glucosyltrans ferase, EC. 2.4 1.3

لهذا النوع من التفاعلات أهمية خاصة في الأحياء المجهرية وتستخدم الطاقة الموجودة في الأواصر الكليكوسيدية للمركبات المانحة (جدول 2-7) لتخليق الأواصر الكليكوسيدية الجديدة. يتضح من الجدول (2-7) بأن للأصرة C-N في المركب UDP- glucose طاقة أكبر بقليل من الآصرة الكليكوسيدية للسكروز، كما أن السكروز يكون واهبا أفضل لمجموعة الكليكوسيل من المركب Glucose-1- phosphate وأفضل بكثير من المالتوز، ولهذا يستخدم بمثابة واهب لمجموعة الكليكوسيل عند تخليق الديكستران Dextran والليفان Levan جدول (2-5).

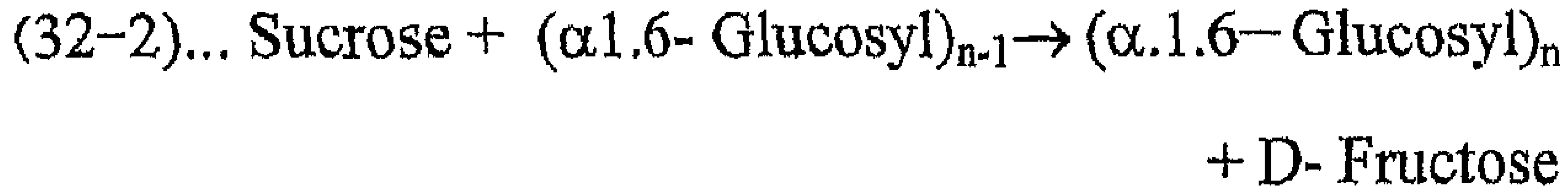
جدول (2-7) طاقة التحلل المائي للمركبات المانحة للكليكوسيل Glycosyl donors وبعض عديدات السكريد

Compound المركب	AF^0 Cal/ mole
Glucose 1- phosphate	5500-
UDP- glucose	7600-
Sucrose	6600-
Maltose	3000-
Glycogen	4300-
Dextran	2000-
Levan	4600-

وعند ملاحظة الجدول (2-6) تتضح أهمية الأنزيم Dexrtansucrase في التصنيع الغذائي، إذ يمكن استخدام الديكستران ذي الأواصر α1-6 الكليكوسيدية بوصفه عامل تركيز Thickening agent للأغذية ذات الحمية الغذائية Dietetic foods ذلك لأن الإنسان لا يملك في قناته الهضمية الأنزيمات التي تحلل هذا البوليمر بسرعة ملحوظة. كما تستخدم الديكسترانات على أنها مواد أولية في إنتاج أو تحضير مادة السيفاديكس التي تستخدم في الترشيح الهلامي للجزيئات الحيوية بهدف فصلها وتنقيتها كما تستخدم في عملية نقل الدم ولأغراض أخرى مختلفة. ويعد الأنزيم Dextransucrase مسؤولا عن الطبيعة اللزجة أو الغروية للبيرة والمنتجات الأخرى.

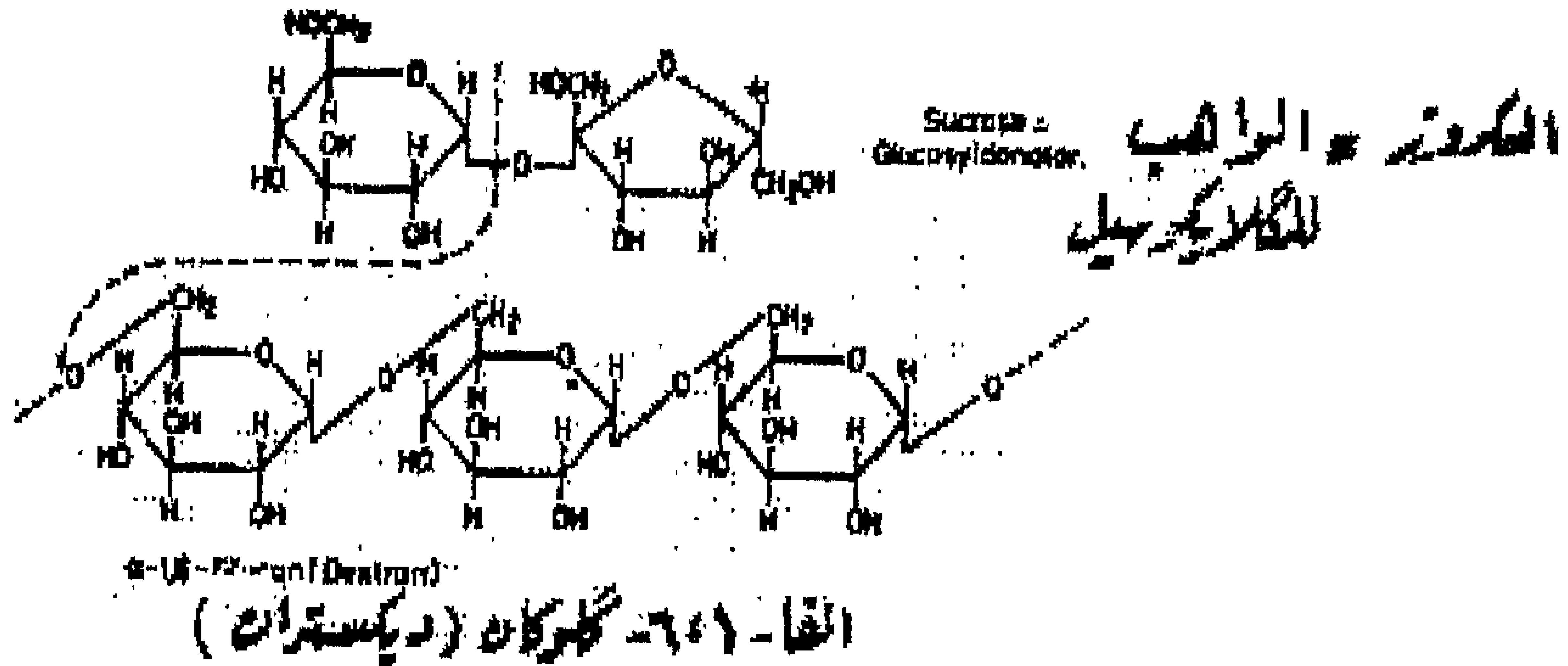
تجابه معامل السكر مشكلة انسداد الأنابيب بسبب تحول السكروز إلى الديكستران لزج القوام نتيجة لنمو البكتيريا الحاوية على أنزيم Dextran

sucrase وكمثال Leuconos- Toc mesenteroids ويمكن توضيح التفاعل اللاعكسي، الذي يحفزه الأنزيم كالآتي:-



$$(32-2)...\ Sucrose + (\alpha 1.6\text{- Glucosyl})_{n-1} \rightarrow (\alpha.1.6\text{- Glucosyl})_{n} + D\text{- Fructose}$$

ويمكن توضيح عملية نقل الكليكوسيل في المخطط الآتي:-



الفا -٦،١- كلوكان (ديكسترات)

إن تخليق الديكستران يتم في غياب أيونات الفسفات ويتضح من المعادلة (32-2) بأن الأنزيم ينقل الكلوكوز من السكروز إلى جزيئة ديكستران من النوع (α-1-6) ذات وزن جزيئي منخفض وبهذه الطريقة يزداد طول سلسلة الديكستران تدريجياً.

يمتلك أنزيم Dextran sucrase تخصصا عاليا للسكروز بوصفه مركبا مانحا للكلوكوز ولكن تخصصه واطيء نسبيا تجاه المستقبل. إن أحسن المستقبلات هي الديكسترانات ذات الأوزان الجزيئية الواطئة، غير أن هناك مركبات أخرى يمكن أن تكون بمثابة مستقبلات مثل ايزومالتوز Isomaltose ومالتوز وفركتوز وكلوكوز وميلوبيوز Melobiose وكلاكتوز ولكن سرعة تخليق الديكستران تكون واطئة بوجود هذه المستقبلات وكذلك الحال مع

حجم الناتج، كما يعتمد حجم الناتج على تركيز المستقبل فعند وجود تركيزات عالية من الكلوكوز، يتكون فقط ثنائي السكريد وثلاثي السكريد ونسبة قليلة جدا من عديد السكريد.

يعين نشاط الأنزيم Dextransucrase بالزيادة الحاصلة في سكر الفركتوز المختزل أو بقياس لزوجة المحلول.

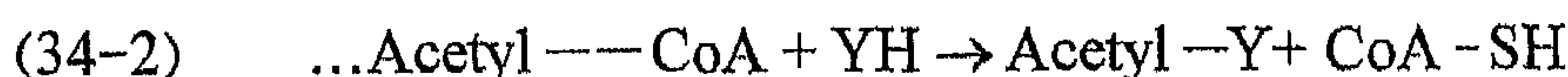
لا يمكن تثبيط Dextransucrase بالأيونات F^- وCN^- و CU^{2+} وAg^+ وخلات اليود ولا بالديلزة. وهناك أبحاث تشير إلى أن الأكسدة الضوئية تفقد الأنزيم نشاطه.

2-7-2 ناقلات مجاميع الإسيل Acyltransferase. Ec 2.3

تحفز هذه الأنزيمات نقل مجاميع الآسيل من الجزيئات المانحة إلى الجزيئات المستقبلة كما في المعادلات التالية (2-33، 2-34) التي توضح نقل مجموعة استيل عن طريق تميم الأنزيم A(Coenzyme A):



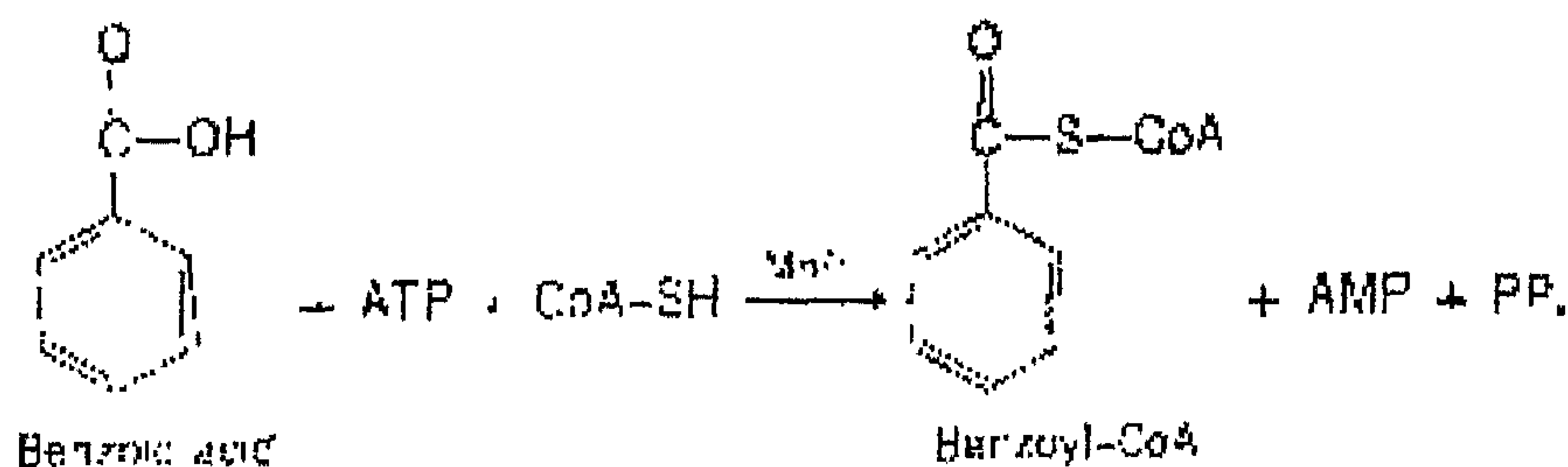
$$\text{Acetyl}-x+\text{Coa}-\text{SH}\rightarrow \text{Acetyl}-\text{S}-\text{CoA} + \text{XH} \quad (33-2)$$



$$\text{Acetyl}--\text{CoA} + \text{YH} \rightarrow \text{Acetyl}-\text{Y}+ \text{CoA}-\text{SH} \quad (34-2)$$

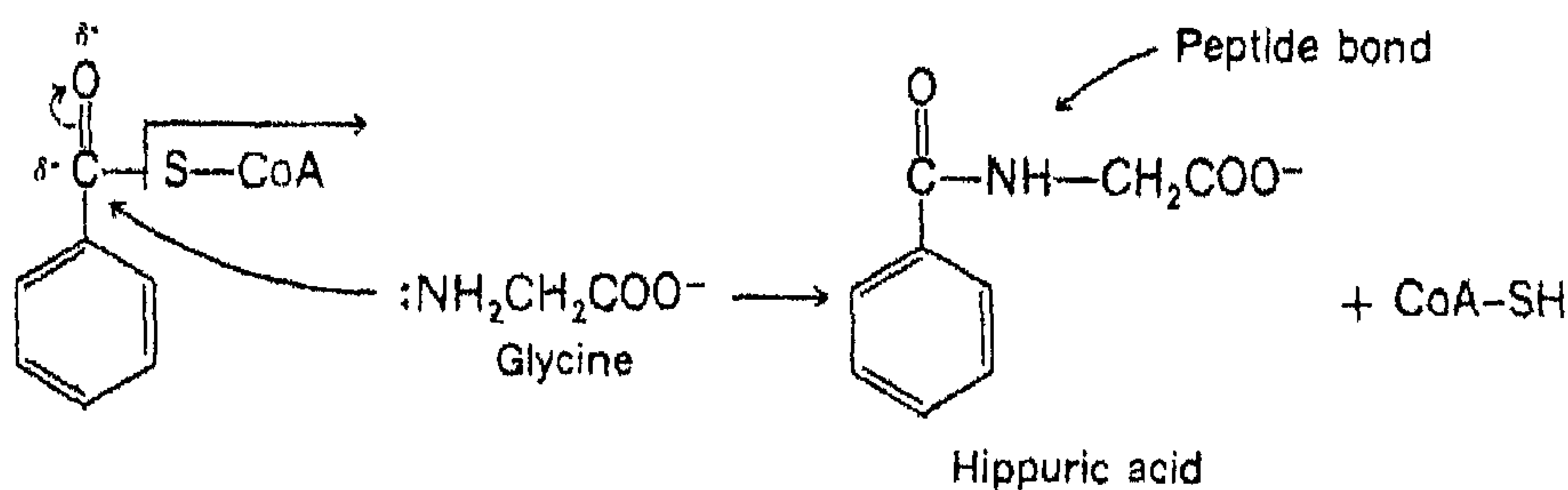
ملاحظة: يرمز CoA هنا إلى تميم الأنزيم A دون مجموعة الثايول (SH_).

يلعب تميم الأنزيم A دوراً مهماً في العمليات الأيضية وكمثال دورة حامض الستريك وتخليق الأحماض الدهنية ونكوصها Degradation وتخليق ثلاثيات الكلسيريد Triglycerides والفسفتيدات phosphatides كما يلعب دوراً مهماً في إزالة سمية حامض البنزويك Benzoic المستخدم بوصفة مادة حافظة preservative في الأغذية المصنعة إذ يقترن به بتحفيز أنزيم Acyl—CoA synthetase



(35 -2) ...

وبتحفيز أنزيم Glycine acyltransferase يتم نقل جزء البنزويل إلى الحامض الأميني Glycine لتكوين حامض الهيبورك Hippuric الذي يتم إفراغه excreted عن طريق الإدرار.



(36 -2) ...

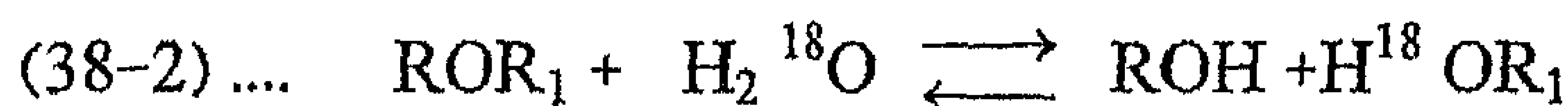
8-2 أنزيمات الهدرولاز (Hydrolases)

تحفز أنزيمات الهدرولاز التحلل المائي للركائز بنقل مكوناتها إلى الماء:



$$\text{(37-2)} \quad ... \quad Y-X + HOH \rightleftharpoons HX + YOH$$

ولقد ادى استعمال H_2O^{18} في التفاعل إلى توضيح آلية عمل الكثير من أنزيمات هذه المجموعة، وعلى سبيل المثال تحفز الأنزيمات Glucoside hydrolases التحلل المائي لأصرة الكلوكوسيد ويمكن أن يتم ذلك بأحد طريقتين:



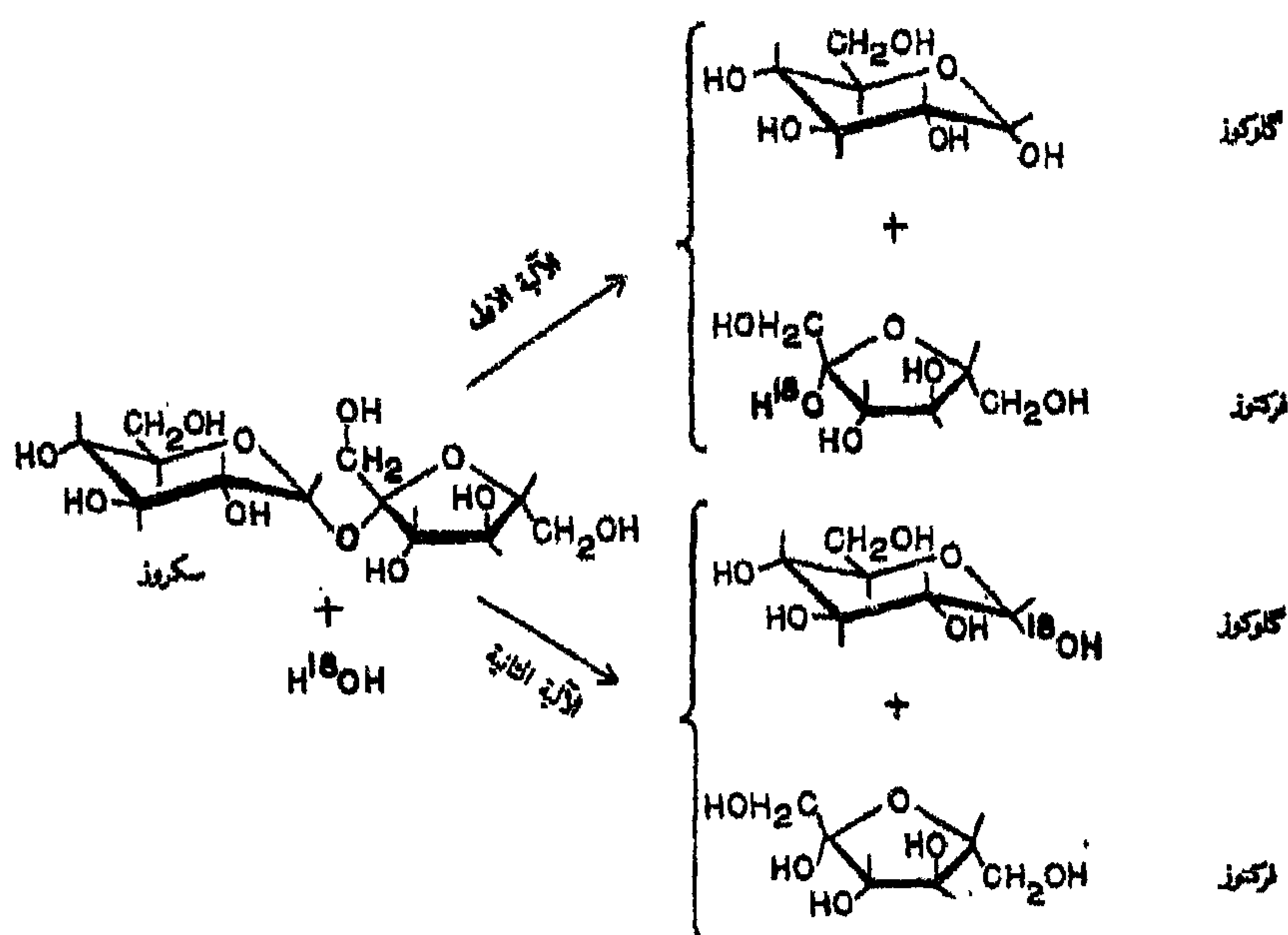
$$ROR_1 + H_2{}^{18}O \rightleftarrows ROH + H^{18}OR_1 \quad \text{.... (38-2)}$$



أو

$$ROR^1 + H_2{}^{18}O \rightleftarrows R^{18}OH + HOR_1 \quad \text{.... (39-2)}$$

فإذا كانت الركيزة ROR_1 سكروز مثلا يتكون فركتوز حاو على ^{18}O حسب الآلية الأولى بينما يكون الكلوكوز موسوم بالنظير ^{18}O في الآلية الثانية وكما يأتي:



ويمكن إثبات الآلية باستخدام المرسام الطيفي الكتلي Mass Spectrometer.

تقسم أنزيمات الهدرولاز إلى أصناف ثانوية تبعا لنوع الآصرة التي تحفز تحللها المائي (جدول 2-8).

جدول (2-8) الأصناف الثانوية لأنزيمات الهدرولاز تبعا لطبيعة الآصرة التي تحفز تحللها المائي.

الرقم النظامي (Ec. No)	التسمية الثانوية	عدد الأنزيمات
3.1	التي تعمل على أواصر الاستر	62
3.2	التي تعمل على أواصر الكلوكوسيل	45
3.3	التي تعمل على أواصر الأثير	1
3.4	التي تعمل على أواصر الببتيدية	39
3.5	التي تعمل على أواصرC-N غير الأواصر الببتيدية	46
3.6	التي تعمل على أواصر انهدريد الحامض	12
3.7	التي تعمل على اواصر c-c	3
3.8	التي تعمل على اواصر الهاليد	2
3.9	التي تعمل على اواصر P-N	1

2-8 -1 أنزيمات الليباز Lipases

تعمل أنزيمات الليباز (Glycerol ester hydrolase.EC3.1.1.3) على التحليل المائي لثلاثيات الكلسيريد



(2-40)... Triglyceride $+ H_2O \rightleftarrows$ Diglycerid+ Fatty acid

وتوجد هذه الأنزيمات في العصارة البنكرياسية وبلازما الدم وفي الأمعاء الدقيقة واللعاب والحليب والشوفان والقمح وفول الصويا السوداني وفي البكتريا والعفن Mold. إن ليباز الحليب مسؤول عن تزنخة rancidity الناتج وعن التحلل

المائي للدهون. وتلاحظ هذه الظاهرة في الحليب سيء البسترة أو الحليب المتروك دون بسترة وكذلك في الزبدة.

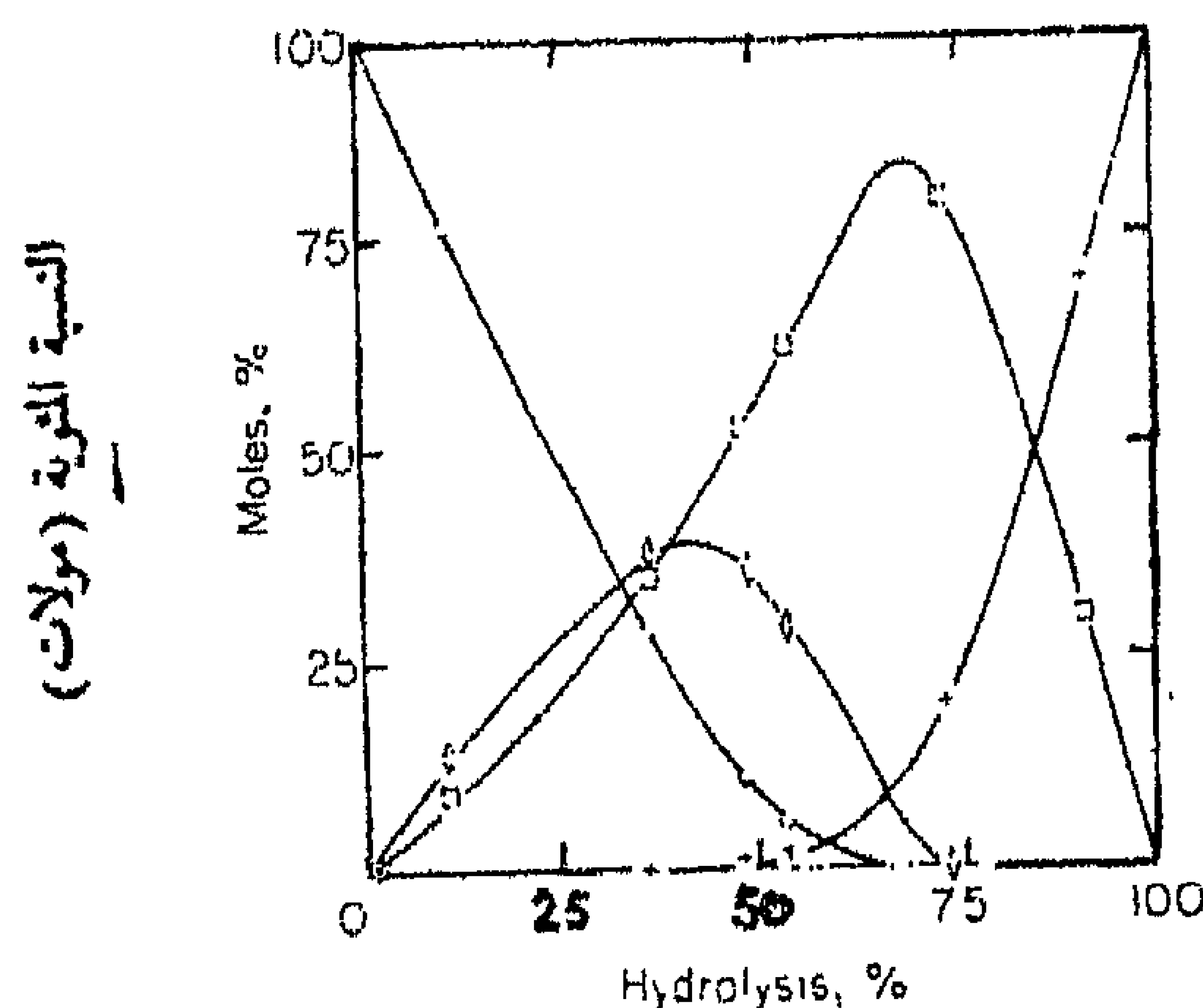
تعمل أملاح الصفراء وخاصة Taurocholte بوصفها منشطا لأنزيم الليباز ويعود هذا بدرجة رئيسة إلى التأثير الاستحلابي لهذه الأملاح.

يختلف الرقم الهدروجيني الأمثل للأنزيم لمصدره فالأنزيم المستخلص من الحليب فعالية قصوى في الرقم الهدروجيني (9.0) فيما يكون الرقم الأمثل لأنزيم البنكرياس (8.0) ولأنزيم بذور الخروع (4.3) ولأنزيم الأحياء المجهرية (5-6). وهكذا الحال مع درجة الحرارة المثلى إذ تختلف مع المصدر. يظهر ليباز الحليب مقاومة عالية للحرارة.

2-8-1-1 خصوصية أنزيم الليباز

إن معدل السرعة النسبية للتحلل المائي لثلاثيات الكلسيريد أعلى منها لثنائيتها وهذه تحلل بسرعة نسبية أعلى منها لأحاديات الكلسيريد كما في الشكل (2-29)، فعند حضن ثلاثيات الكلسيريد مع الأنزيم وتقدير كميات ثلاثيات الكلسيريد وثنائيتها وأحاديتها والكلسيرول في فترات زمنية مختلفة لوحظ انخفاض سريع في ثلاثيات الكلسيريد وازدياد سريع في ثنائيات الكلسيريد وازدياد قليل نسبيا في أحاديات الكلسيريد. وأما محتوى الكلسيرول فقد كان قليلا حتى المراحل الأخيرة من التفاعل حيث تناسبت سرعة تكونه مع سرعة تحلل أحاديات الكلسيريد.

لقد أظهرت الأبحاث المختلفة بأن ليباز البنكرياس يهاجم المواقع 1 و3 لثلاثيات الكلسيريد وتنتج عن ذلك أحاديات اسيل الكلسيرول. وقد تم إثبات ذلك باستخدام الأنواع الثلاثة التالية لثلاثيات الكلسيريد:



النسبة المئوية للتحلل المائي

شكل (2- 29) تسلسل الأحداث عند التحلل المائي لثلاثيات الكلسبريد بفعل انزيم الليباز المستخلص من الخنزير. اجريت التجارب بوجود أيونات الكالسيوم و Taurocholate. (O)، ثلاثيات أسيل الكلسيرول (O)، ثنائيات اسيل الكلسيرول (O)، أحاديات أسيل الكلسيرول. (+) كلسيرول.

(أ) 1.3- Dipolmity 1-2- oleyl glyceride (pop)

(ب) 2.3- Dipalmityl-1- oleyl glyceride (op)

(ج) 2.3- Dioleyl-1 palmity glyceride (poo)

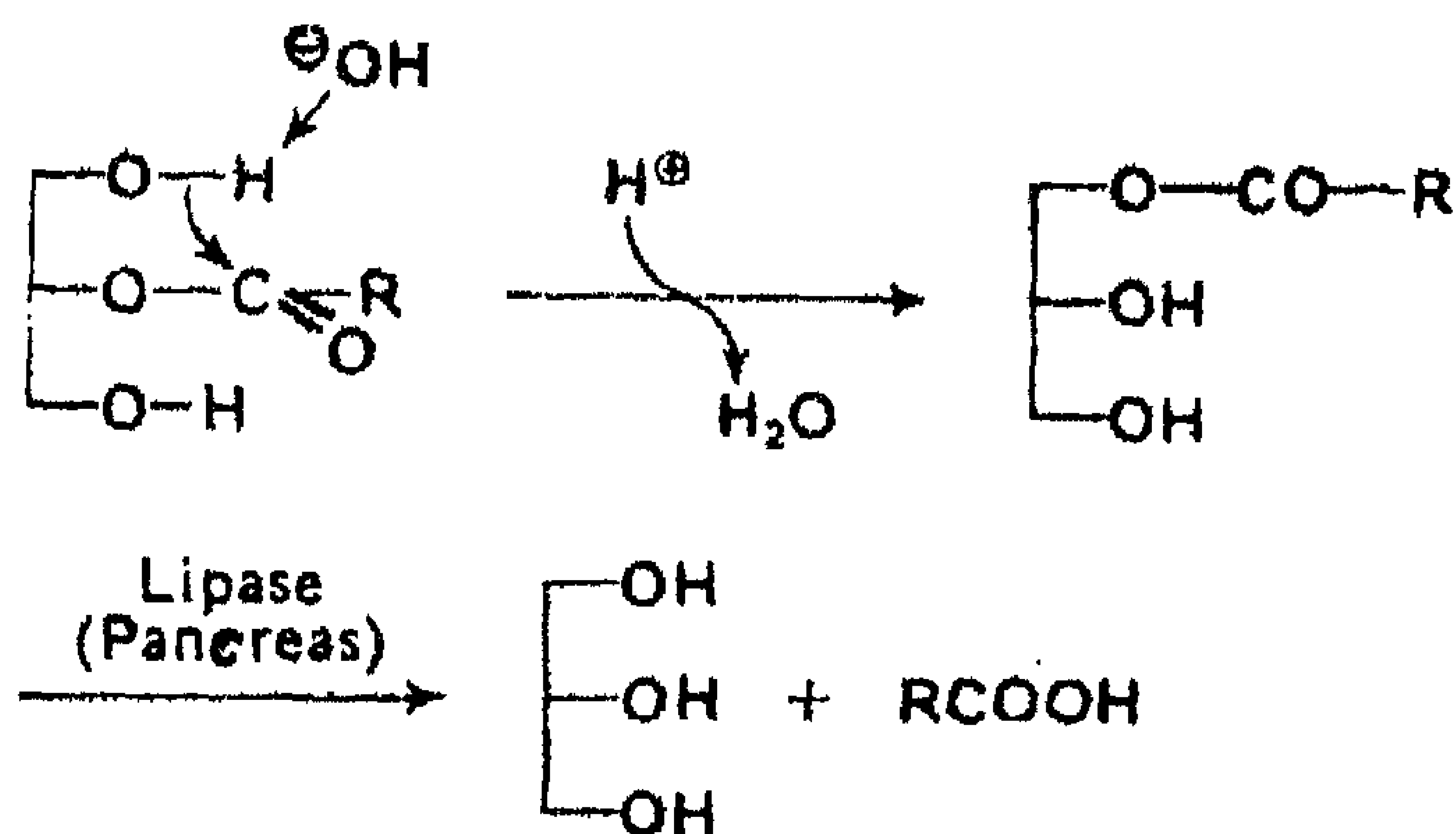
فـأذا تم شـطر آصـرة الاسـتر عـشوائياً بغـض النظـر عـن موقعهـا ، تـكـون النـسبة المئويـة لتحـرر حـامض الأوليـك Oleic متـساوية لـكـل مـن OPP pop وتمثل نصف ما هـي عليه لتحرر الحامض ذاته من المركـب POO. أما إذا كان المفضل مهاجمة الموقعين 1و3 فإن النسبة المئوية لتحرر حامض الأوليك متساوية تقريبـاً لـكـل مـن POO OPP وأكـثـر بـكـثير منهـا للمركـب POP وهـذا مـا يلاحظ من الجدول (2-9).

جدول (2-9) توضيح لتخصص أنزيم اللبياز البنكرياسي (للخنزير)

لموقع الأصرة التي يحفز تحللها المائي

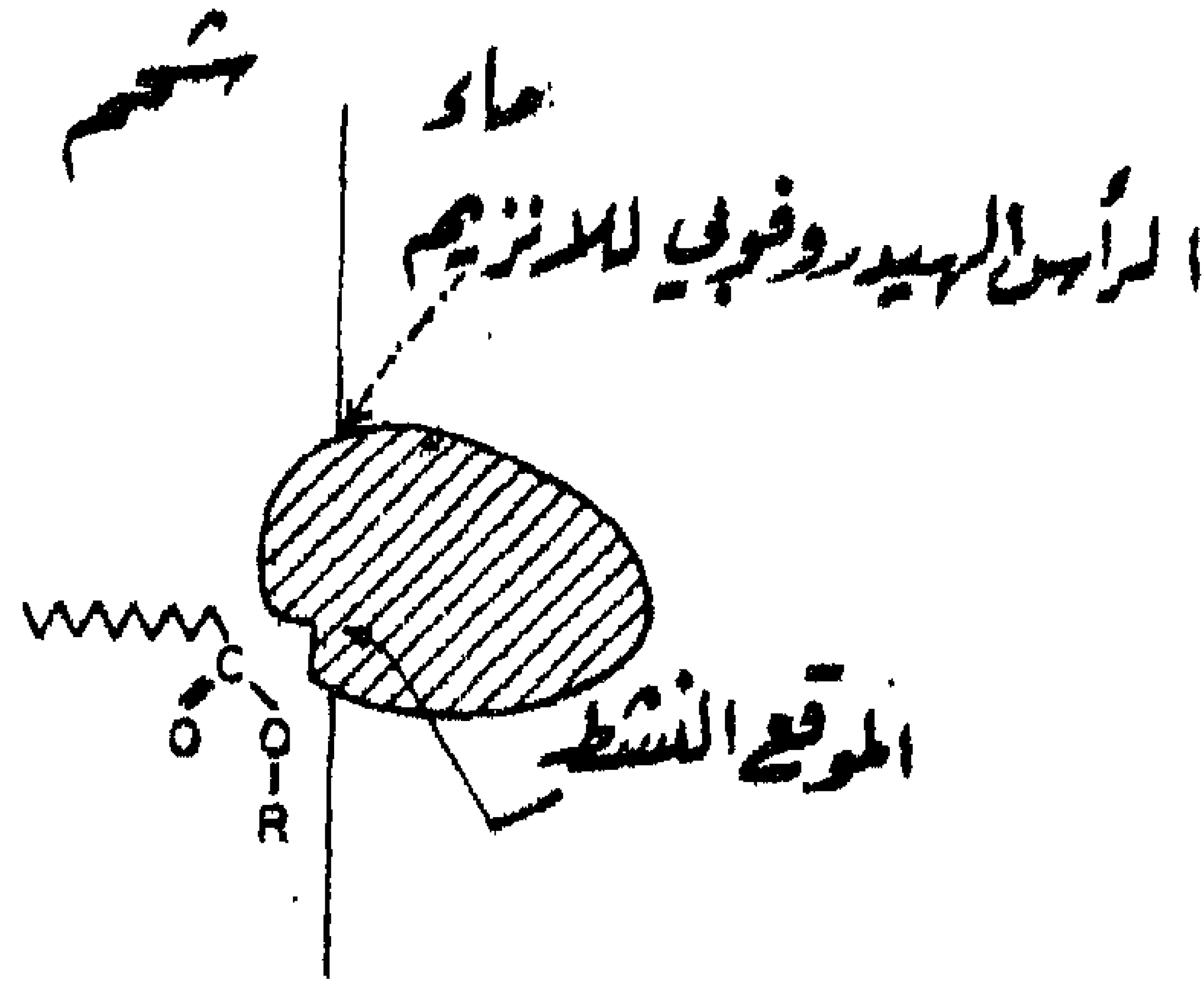
الركيزة	محتوى حامض الاوليك (مولات/ 100 مول ركيزة)	
	أحماض دهنية حرة	أحاديات الكلسيريد
.3 - Dipalmity- 2- oley glyceride (pop)1	5	89-87
.3 Dipalnntyl-1- oleyl glyceride (opp)2	51-46	4
.3 Dioleyl - 1 - palmityl glyceride (poo)2	53-58	86-76

إن التحلل المائي البطيء للأصرة في الموقع 2 يكون نتيجة لإنتقال الاسيل من هذا الموقع إلى الموقع 1 في PH=1 ويتبع ذلك التحلل المائي من هذا الموقع



(40-2) ...

يعمل ليباز البنكرياس فقط في الطور البيني شحم/ ماء ويفترض بأن الراس الكاره للماء للأنزيم يثبت في قطرة الدهن من خلال التآثرات الكارهة للماء Hydrophobic interactions بينما يوجه الموقع النشط للأنزيم إلى الأصرة الاسترية لجزيئة الركيزة (شكل 2-30).

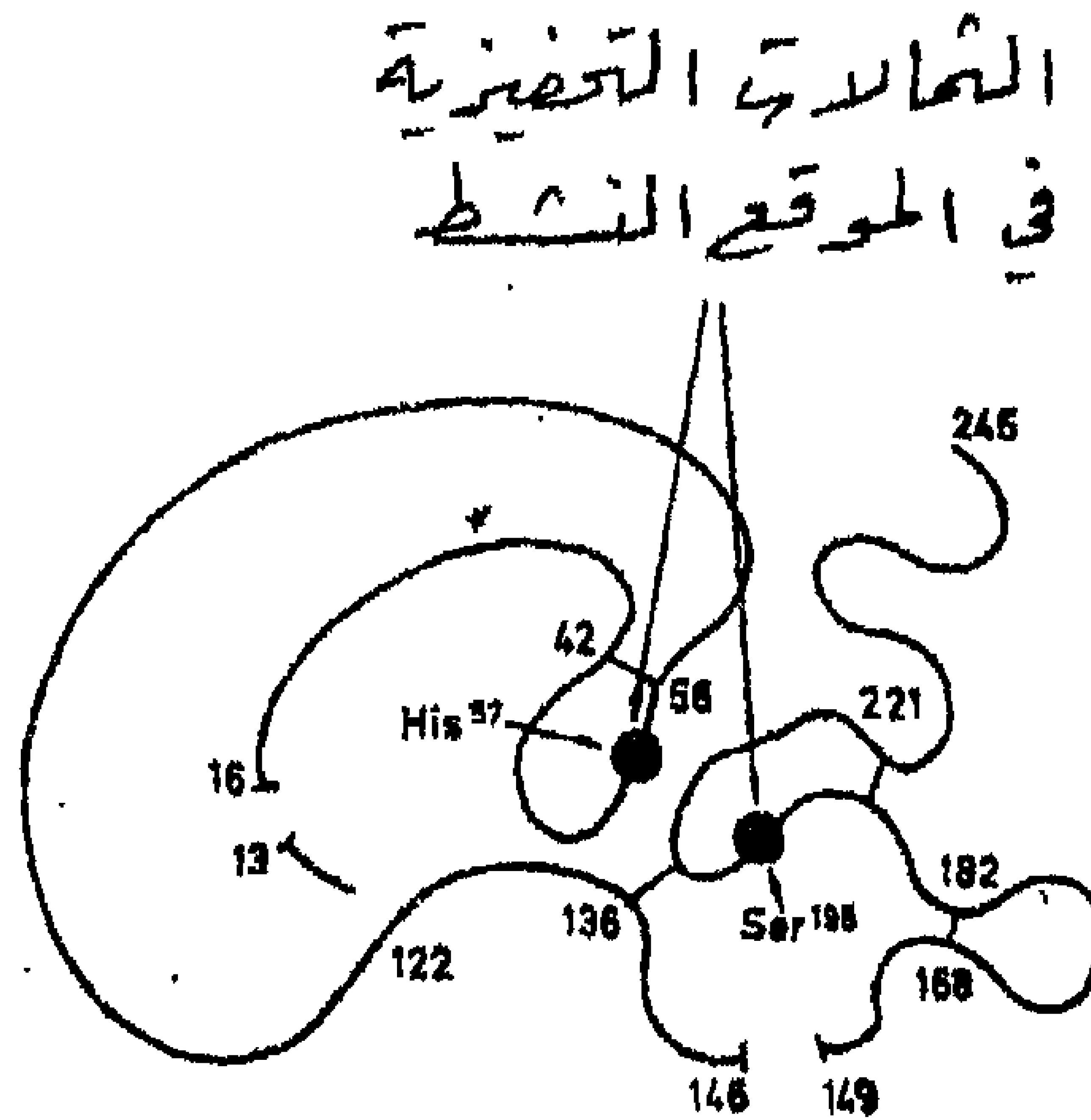


شكل 2- 30: النموذج المقترح لتفسير فعالية ليباز البنكرياسي في الطور البيني شحم/ ماء

ولهذا فإن ليباز البنكرياس ذو نشاط واطيء تجاه ثلاثي الكلسيريد المسمى Triacetin لإنه ذائب. وتعتمد سرعة التحلل المائي للشحوم على طول سلسلة مجموعة الاسيل ويفضل ليباز البنكرياس مهاجمة الكلسيريدات الحاوية على حامض البيوتريك. ولقد لوحظ بأنه كلما كان الطور البيني (شحم/ماء) أكبر كانت قطرة الشحم أصغر ونشاط الأنزيم أكبر ولهذا يجب مراعاة هذه العلاقة عند تحضير مستحلب الركيزة وعند قياس نشاط الأنزيم.

2-8-1-2 الموقع النشط لأنزيم الليباز

يشبه الموقع النشط لأنزيم الليباز، الموقع النشط لبروتينازات السرين Proteinases serine- حيث تتكسر الآصرة الاسترية باشتراك كل من الأحماض الأمينية serine و Histidine و Aspatic (شكل 2-31). تتشابه آلية التفاعل المحفز بأنزيم الكيموتربسين معها للتفاعل المحفز بأنزيم الليباز ويختلف أنزيم الليباز البنكرياسي عن أنزيمات serine proteinases- باحتوائه على الحامض الأميني Leucine الذي يرتبط بتآثرات كارهة للماء Hydrophobically بالركيزة



شكل 2- 31 ترتيب عديد الببتيد في جزيئة الكيموتربسين

يمكن تعجيل تفاعلات الليباز وخاصة في المراحل النهائية لتحلل ثلاثيات الكلسيريد باستعمال أويونات الكالسيوم (Ca^{++}) حيث يتم إزالة الأحماض الدهنية الحرة كأملاح الكالسيوم غير الذائبة.

يشبه ليباز الحليب من حيث الصفات، ليباز البنكرياس. ولقد لوحظ بأن أنزيمات الليباز المنتجة من قبل الأحياء المجهرية عالية التخصص لكونها تحلل مائياً الأحماض الدهنية الحاوية على أواصر مزدوجة من النوع (cis) وفي الموقع 9

فقط. ومن الجدير بالاهتمام التحلل المائي لثلاثيات الكلسيريد في الحليب بالفعل الضعيف لأنزيم الليباز مما يؤدي إلى تكوين مركبات النكهة. كما أن فعل ليباز القمح وأنواع أخرى من الحبوب يمكن أن يؤدي إلى فساد هذه المنتجات.

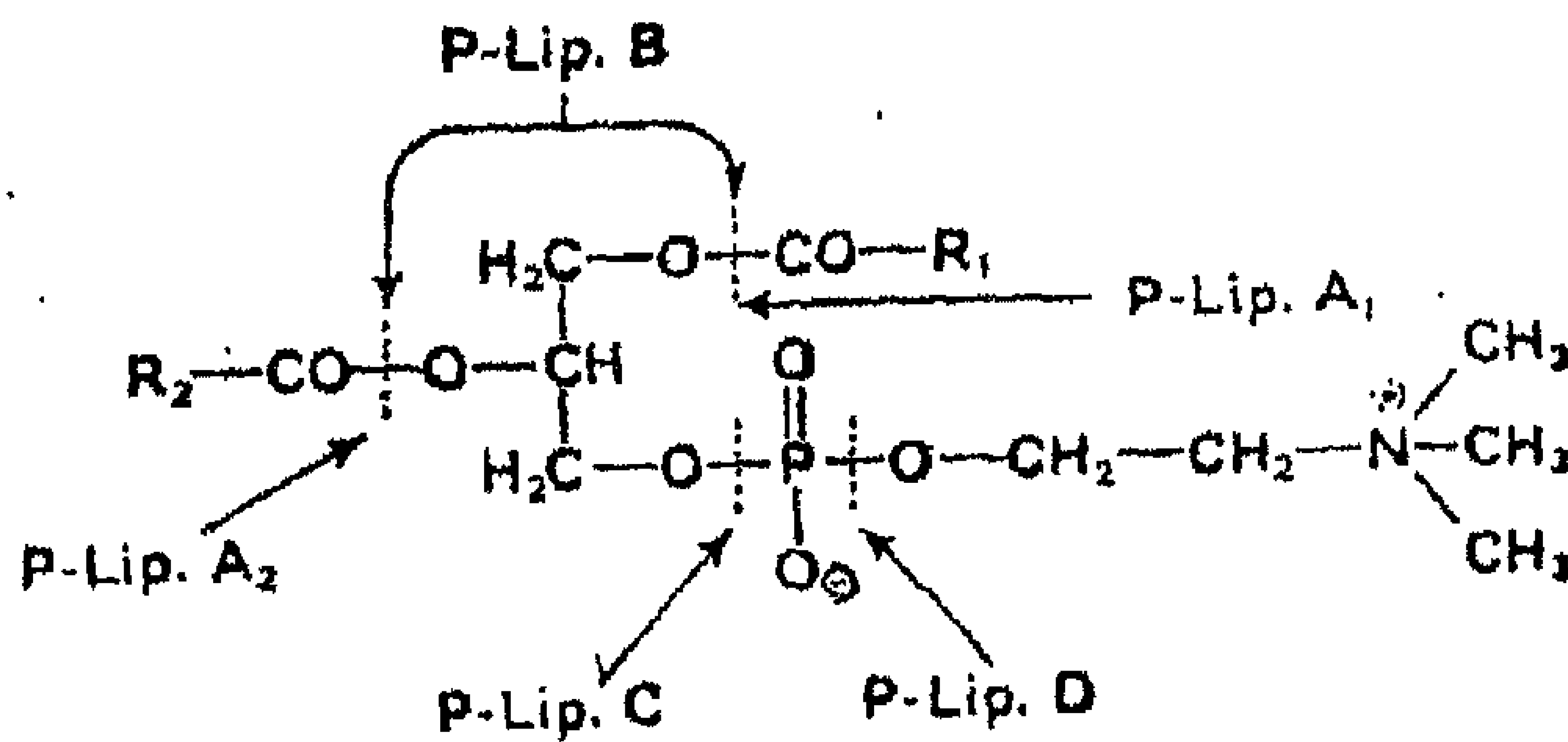
وقد تستخدم مستحضرات أنزيم الليباز المعزول من الأحياء المجهرية لصوبنة Saponification الشحوم وإبقاء المواد الفعالة مثل التوكوفيرول Vitamin E فعند استخدام أنزيم الليباز المستخرج من Apergillusniger أمكن تصبنة 93٪ من زيت الزيتون و91٪ من زيت أجنة القمح و86٪ من زيت بذور القطن و85٪ من زيت الصويا وعلى العكس ما ذكر يمكن تصبنة 48٪ فقط من دهن جوز الهند أنزيميا وذلك لاحتوائه على مركبات مثبطة لعمل الأنزيم مثل الأحماض الدهنية الهدروكسيلية وحامض اللورك Lauric وأحماض حاوية على أواصر مزدوجة متبادلة bonds Conjugated double

2-8-2 أنزيمات التحلل المائي للشحوم القطبية Polar lipids

تدعى هذه الأنزيمات نسبة إلى ركائزها وكمثال phospholipases و Glycolipid hydrolases

1-2-8-2 phospholipases:

وهي الأنزيمات التي تحلل مائياً الفسفاتيدات وتكون ذات خصوصية عالية وتستخدم للتعرف على تركيب الفسفاتيدات يبين الشكل (2-32) مواقع عمل الفسفوليبازات A_1 و A_2 و B وC و D.



شكل (2- 32) مواقع فعل الفسفوليبابازات: A_1، A_2، B و C و D.

Phospholipase A_1 (Ec 3.1.1.32) : تم فصل هذا الأنزيم من مخ الفئران ويعمل على تحرير الحامض الدهني في الموقع 1 من مركبات اللسثين وLyso-lecithin.

phospholipase A_2 (Ec 3.1.1.4): يعمل هذا الأنزيم على تحرير الحامض الدهني في الموقع (2) وقد تم فصله من بنكرياس الخنزير وسم الأفاعي.

Phospholipasr B (EC 3.1.1.5): يحرر هذا الأنزيم الدهني في الموقع 1 و2 من المركبات Lyso-phosphatides وقد أمكن فصل الأنزيم من مخ الفئران- بينما لا يوجد فيه phospholipase A ولم يمكن العثور لحد الآن على أنزيم النباتات.

وفي الأدبيات القديمة، سمي الأنزيم المحرر لكلا الحامضين الدهنيين من فسفاتيد T باسمphospholipase B ولقد وجد مثل هذا الأنزيم في الشعير.

Phospholipase C (Ec 3.1.4.3) ويحلل مائياً اللسثين إلى 2.1–Diacylglyceride و phosphorylcholine وقد تم الحصول عليه من سم الأفاعي والبكتريا.

Phospholipase D (Ec 3.1.4.4) وينقل جزء الفسفاتيد إلى جزيئة ماء أو كحول (ايثانول أو ميثانول أو كليسيرول) كما في المعادلة (2-41)



Phosphatidyl - choline + ROH → phosphatidyl – OR + choline



(41 -2) ...

$CH_2(OH)-CH(OH)-CH_2$ أو CH_3CH_2 أو H=R

لا يعمل هذا الأنزيم على المركب فسفاتديل – انوستول inositol phosphatidyl–
وينتشر في الحبوب مثل القمح والحنطة السوداء وكذلك في البقوليات كما تم استخلاصه من الفول السوداني.

ملاحظة: يتضح ما تقدم بأن فسفوليباز C وD من أنزيمات الفسفاتاز phosphatases وبعبارة أدق phosphodiesterases فيما تعد فسفوليباز A_1 و A_2 و B أنزيمات التحلل المائي للاسترات الكربوكسيلية Carboxylic estar hydrolases وسوف نتناول أنزيمات الفسفاتاز لاحقاً.

Glycolipid- hydrolases 2-2-8-2:

يوجد في الأجزاء الخضراء للنباتات أنزيمات تحرر الحامض الدهني من Monogalactosyl- diacylglycerides و Digalactosyl diacycerides-. أظهرت أنزيمات الهدرولاز Hydrolases المعزولة من البطاطا بأن هناك أنزيمات في النباتات تستطيع أن تحلل مائياً الشحوم القطبية، ويفضل أنزيم البطاطا فلق ثمالة Residue الحامض الدهني من الكلسيريدات أحادية الاسيل glycerides-Monacyl و Lysolecithin ولكنه لا يعمل على المركب Triolein (لاحظ الجدول (2-10).

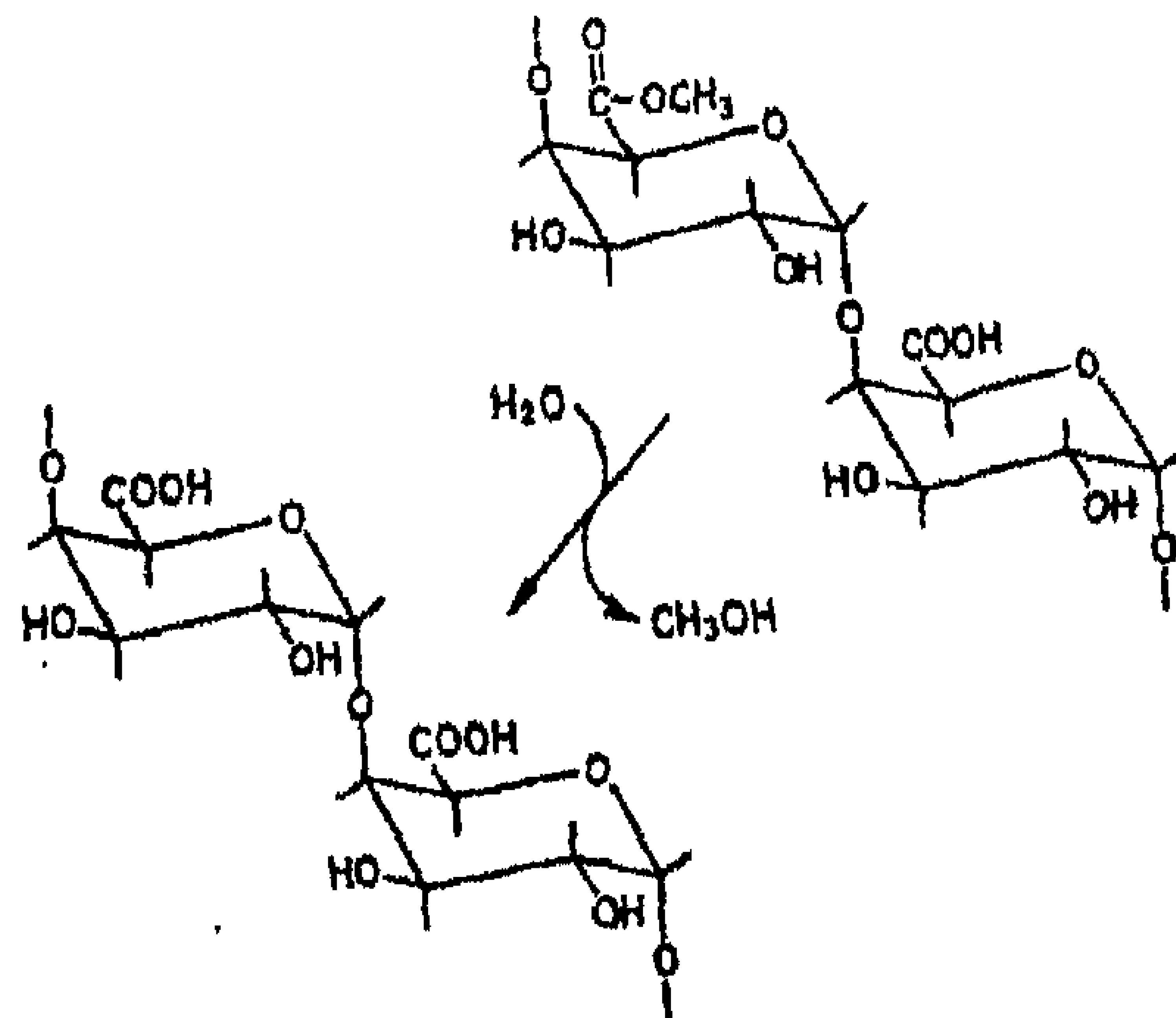
جدول (2-10) التخصص لركيزة أنزيم الـ Acylhydrolase المنقى من البطاطا

الركيزة (Substrate)	النسبة المئوية للنشاط النسبي
Mono- oleim	100
Diolein	21
Trioleim	.20
Oleic acid methyl ester	28

النسبة المئوية للنشاط النسبي	الركيزة (Substrate)
72	Lyso-lecthin
13	Lecithin
31	Mono- galactosyl- diacylgyceride
17	Digalactosyl-diacylglyceride
17	

pectin pectylhydrolase -Ec 3.1.1.11 pectinesterases 3-8-2

وتنتمي إلى مجموعة ا لأنزيمات التي تحلل مائياً اواصر استر الكاريوكسيل وتزيل مجاميع الميثوكسيل المؤسترة في كربون رقم (6) من البكتين Pectin محولة إياه إلى حامض البكتك كما في المعادلة (2-42) تزيل الأنزيمات pectinesterase فقط مجاميع الميثوكسيل القريبة أو المجاورة من مجموعة كربوكسيل حرة علماً بأن هذه الأنزيمات تهاجم البكتين المؤستر كلياً بالميثانول بصورة بطيئة جداً.



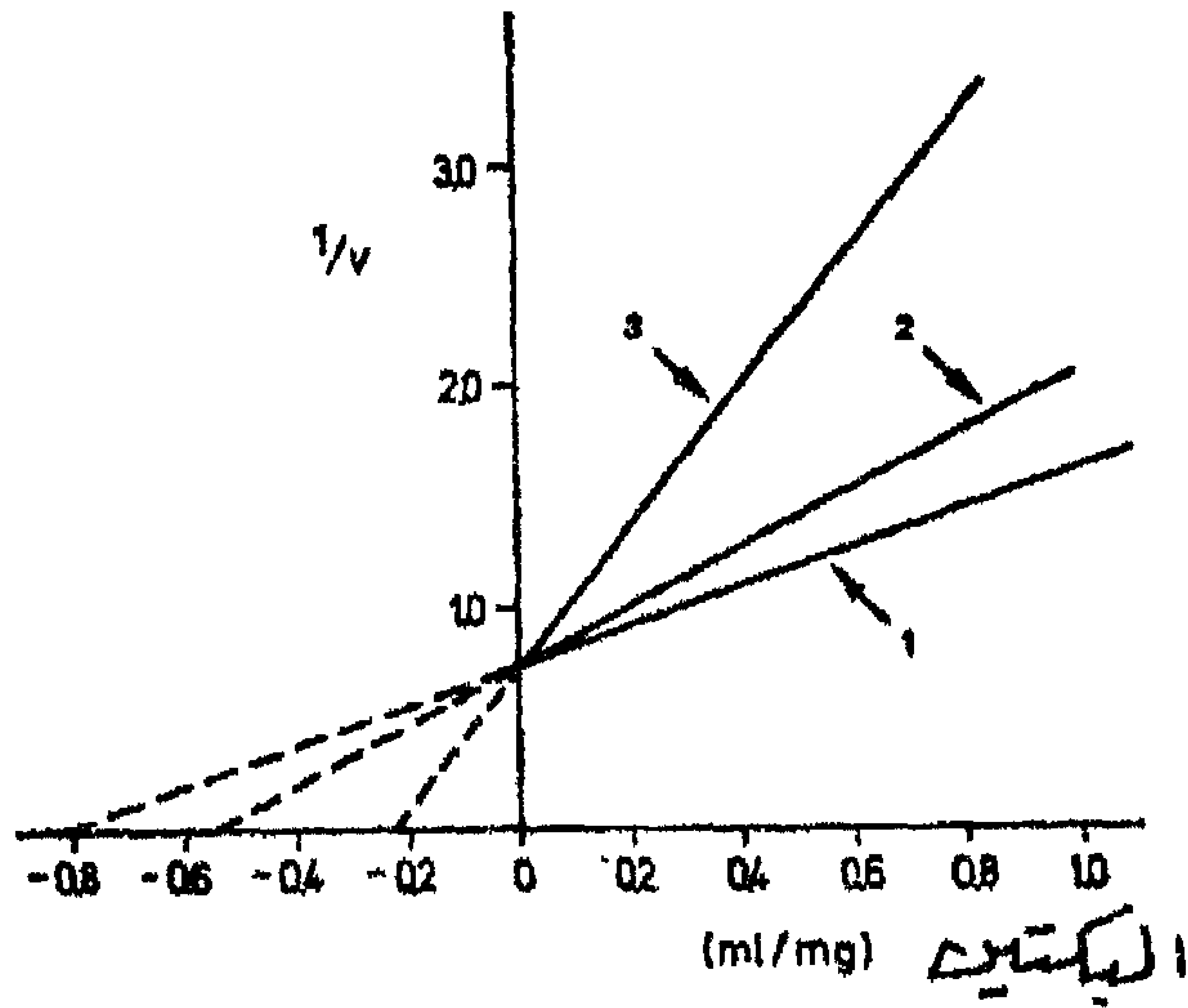
(42-2) ....

تكون أنزيمات البكتين النباتية مقاومة للحرارة اكثر من أنزيمات العفن ويمكن قياس النشاط الأنزيمي في محيط حامضي دون إضافة داريء Buffer. يلعب الأنزيم pectinesterase دوراً في تكنولوجيا الأغذية إذ يوجد مع الأنزيمين polygalacturonase و pectate lyase في العفن A. niger تفصل هذه الأنزيمات سوية وتستخدم لتحسين كفاءة ترشيح عصير الفواكة وترويقه وتسمى الأنزيمات الثلاثة مجتمعة، أنزيمات الترشيح Filtration enzymes.

غالباً ما يستخدم مستحضر الأنزيم pectinesterase الحالي polygalacturonaseو pectate lyase، لتحضير بكتين درجة استرته واطئة وذو وزن جزيئي منخفض يصلح لتحضير الهلام (Gel)

يكون حامض البكتك pectic acid الناتج عن فعل أنزيم pectinesterase مع أيونات الكالسيوم، أملاح صعبة الذوبان في عصير الحمضيات وهذا يؤدي إلى ترسبات غير بلورية Amorphous غير مرغوب فيها. إن استخدام درجة حرارة عالية (90°م) يمنع تكون الترسبات المذكورة إلا أنه يتكون نكهة خاصة غير مرغوب ويمكن تحسين الحالة بالطريقة الآتية:

يمكن تثبيط الأنزيم تنافسياً (شكل 2-33) باستعمال الأحماض مثل Oligogalacturonic و pectic acid وتؤدي هذه الإضافات إلى استقرار الضبابية stability Cloud في عصير الحمضيات ولا تتكون الترسبات آنفة الذكر علما بأن استقرار الضبابية مرغوب فيه عند تصنيع عصير الفواة المركز ومعجون الطماطا، ويجب ألا ننسى بأن الأنزيم pectinesterase مسؤل عن تكوين الميثانول في المشروبات الروحية وعصير الفواكه.

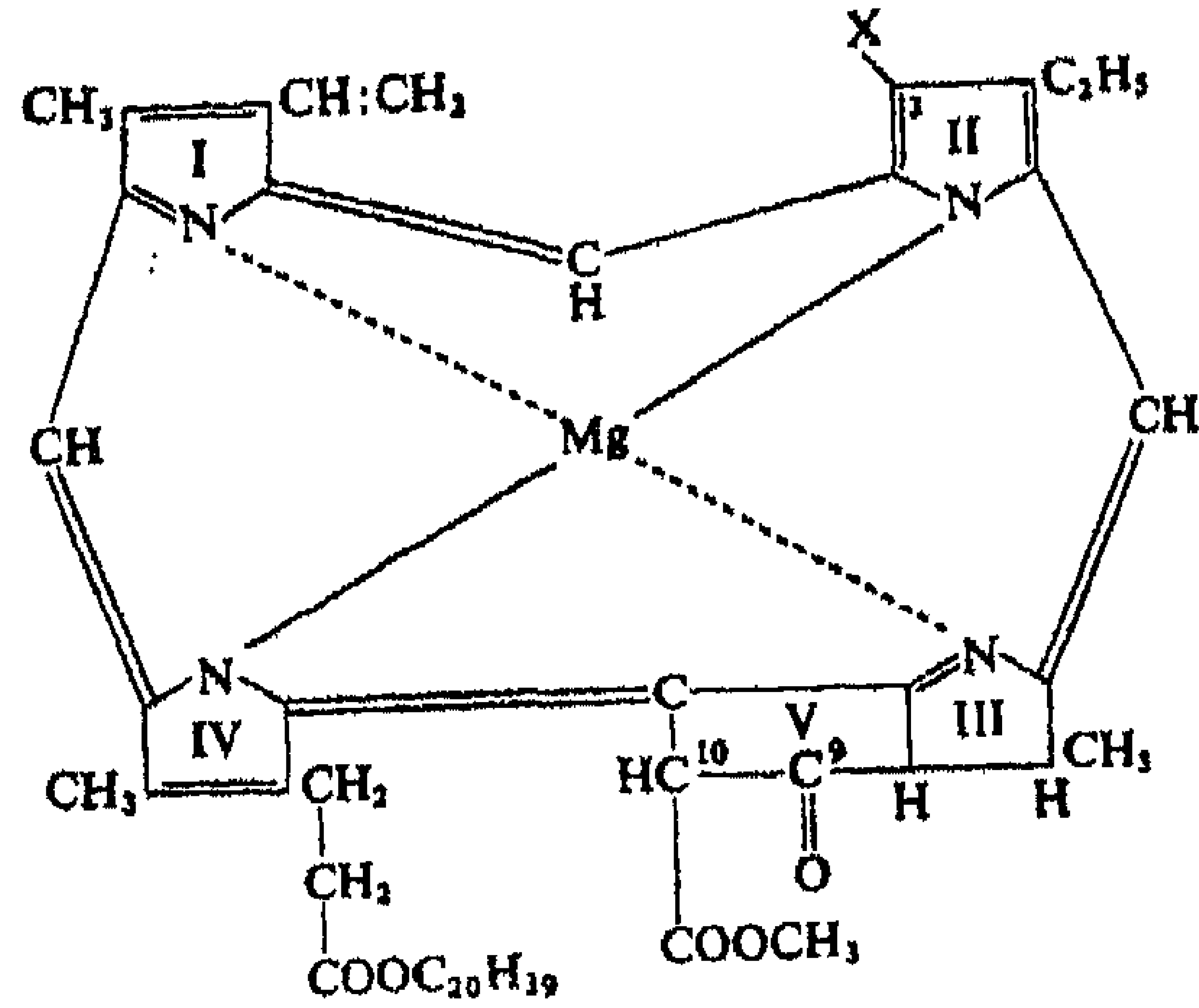


شكل (2- 33) تثبيط انزيم Pectinesterase البرتقال بوجود الأحماض المثبطة (1) لا يوجد مثبط، (2) بوجود Heptagalacturonic acid و Octagalacturonic acid (3) بوجود حامض البكتك Pectic acid.

تختلف الأنزيماتpectinesterase عن بعضها في الرقم الهدروجيني الأمثل حيث يبلغ لأنزيمات العفن حوالي (5) وللأنزيمات النباتية حوالي 7 ولأنزيمات البكتريا 8 تقريباً كما تختلف هذه الأنزيمات في سلوكها تجاه المثبطات.

2-8-4chlorophyllase (Chlorophy ll chlorophy llilido hydrolyase)

يحلل هذا الأنزيم مجموعة الفايتل phytyl group من الكلوروفيل شكل (2-34) ليعطي المركبين فايتول phytol وكلوروفيلايد chlorophyllide



شكل (2- 34) تركيب الكلوروفيل أ و ب في كلوروفيل أ تكون x مجموعة مثيل وفي كلوروفيل ب تكون CHO...

يعتقد بأن الكلوروفيل في النبات يرتبط بالبروتينات الشحمية Lipoproteins مما يقيه من تأثير الأحماض الموجودة بصورة طبيعية في أنسجة النبات، وعند استعمال الحرارة يتخثر Coagulate الجزء البروتيني وبذلك يتعرض الكلوروفيل لتلك الأحماض.

2-8-5 أنزيمات الفسفاتاز phosphoric hydrolases or phosphatases

تحفز هذه الأنزيمات التحلل المائي للأصرة الاسترية التي يكون مصدر الجزء الحامضي فيها حامض الفسفوريك. وتعد المركبات phosphodiester و phosphotriester ركائز لمجاميع الأنزيمات phosphoric monoester hydrolase و phosphoric diester hydrolase و phosphoric triester hydrolase على التوالي.

يعد الحليب والبطاطا والخمائر من المصادر المهمة لأنزيمات الفسفاتاز وتلعب هذه دوراً في تحليل الأغذية يمكن الكشف عن المعاملة الحرارية للحليب بتقدير نشاط أنزيم الفسفاتاز فإذا لم يستدل عليه كان الحليب معاملاً بالحرارة.

تنتمي الأنزيمات فسفوليباز C وD التي مر ذكرها سابقاً ضمن أنزيمات التحلل المائي للشحوم القطبية- إلى أنزيمات الفوسفاتاز وتلعب دوراً في التحولات الأنزيمية في المعجنات الحاوية على البيض.

2-8-5-1 phosphoric monoester hydrolasees, Ec 3.1.3

وتضم مجموعتين:

المجموعة الأولى: وتتميز بتخصص واسع تجاه الركائز فهي تعمل على آصرة الاستر للمركب العضوي أحادي الفسفات وتأتي أهمية ثمالة الكحول بالمرتبة الثانية ولهذا تسمى هذه الأنزيمات غير المتخصصة Non-Specific phosphatases.

المجموعة الثانية: وتكون أعلى تخصصا من سابقتها إذ تتخصص تجاه ثمالة الفسفات وثمالة الكحول ولهذا تسمى فسفاتازات متخصصة Specific phosphatases.

أنزيمات الفسفاتاز غير المتخصصة non-Specific phosphatases

يمكن تقسيمها استناداً إلى الرقم الهدروجيني الأمثل إلى:

أ- أنزيمات الفسفاتاز القاعدية Alkaline phosphatases ويكون الرقم الهدروجيني الأمثل لها بين 9 و10 اعتماداً على مصدر الأنزيم.

ب- أنزيمات الفسفاتاز الحامضية: ويتراوح الرقم الهدروجيني الأمثل لفعاليتها بين 3.5 و 5 اعتماداً على مصدرها.

توجد أنزيمات الفسفاتاز غير المتخصصة في جميع أنسجة الكائنات الحية. يوجد الفسفاتاز القاعدي بتركيزات عالية في غدد الثديات المدرة للحليب وفي

الكلية، ويحتوي مصل الإنسان الطبيعي على كلا الأنزيمين. يوضح الجدول (2-11) التخصص النسبي للركيزة لأنزيمات الفسفاتاز الحامضية من المصادر الثلاثة: الخميرة وكريات الدم الحمراء البروستات Prostate.

يتضح من الجدول بأن التخصص الأنزيمي يكون على أشده لأنزيم الخميرة إذ يحلل مائياً ركيزتين فقط glycerophosphate-x و propandiol phosphate-1 بسرعة يمكن تقديرها فيما يظهر أنزيم البروستات اوطأ درجة للتخصص.

تكون أنزيمات الفسفاتازالحامضية لكريات الدم الحمراء والبروستات عالية النشاط تجاه الركيزة فسفات الفينول phenyl phosphate فيما تظهر أنزيمات الخميرة وكريات الدم الحمراء تخصصاً موقعياً يشاهد من المعدل النسبي للتحلل المائي لكل من α Gylcerophosphate و β-glycerophosphate (جدول 2-11).

جدول (2-11) التخصص النسبي للركيزة لأنزيم الفسفاتاز الحامضي من المصادر الثلاثة: الخميرة وكريات الدم الحمراء والبروستات.

الركيزة بتركيز 0.01 مولار	الفعالية النسبية		
	الخميرة في pH=6.5	كريات الدم الحمراء في pH= 6.0	البروستات في pH=5.5
Phenyl phosphate	1	100	100
α- Gl ycerophosphate	100	33	69
β- Glycerophosphate	1	2	84
Propanediol phosphate-1	76	17	53
phosphoglycerate-3	صفر	4	ضئيلة جداً
Glucose 1- phosphate	صفر	1	19

	الفعالية النسبية		
Glucose 6- phosphate	صفر	صفر	ضئيلة
Ribose 5- phosphate	صفر	8	41
Riboflavin 5- phosphate	صفر	40	35
Adenosine phosphate (2 + 3)	صفر	1	95
Cytidine phosphate (2+3)	صفر	2	94
phosphate–Adenosine 5	صفر	3	60
Adenosine triphosphate	صفر	صفر	صفر
Sodium pyrophosphate	1	1	صفر
Diphenyl phosphate	صفر	صفر	صفر

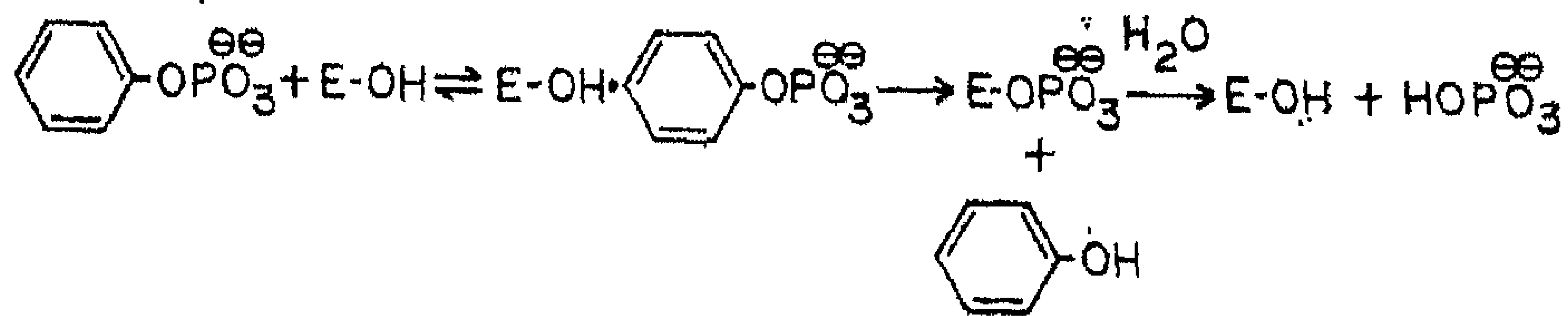
يحلل أنزيم الفسفاتاز الحامضي للبروستات عدداً من النيوكليوسيدات الفسفاتية بينما لا يستطيع ذلك أنزيم كريات الدم الحمراء والخميرة.

تتطلب الأنزيمات الثلاثة (جدول 2-11) وجود أحادي استر الفسفات phos- Phoric monosester ويتضح من عدم مقدرة جميعها على التحلل المائي لثلاثي فسفات الادينوسين ATP وبيروفسفات الصوديوم Sodium pyrophosphate وثنائي فنيل الفسفات Diphenyl phosphate.

لا تثبط معظم أنزيمات الفسفاتاز الحامضية بالعوامل المستخلبة للمعادن Metal Chelating agents ولكنها تثبط بحامض الفسفورك. تنشط بعض أنزيمات الفسفاتاز الحامضية بأيون المغنيسيوم. وعلى العكس من أنزيمات الفسفاتازالحامضية، تثبط أنزيمات الفسفاتاز القاعدية بالعوامل المستخلبة مثل EDTA-x، Dipyridyl, α- α, و O- phenanthroline و Pyrophosphate

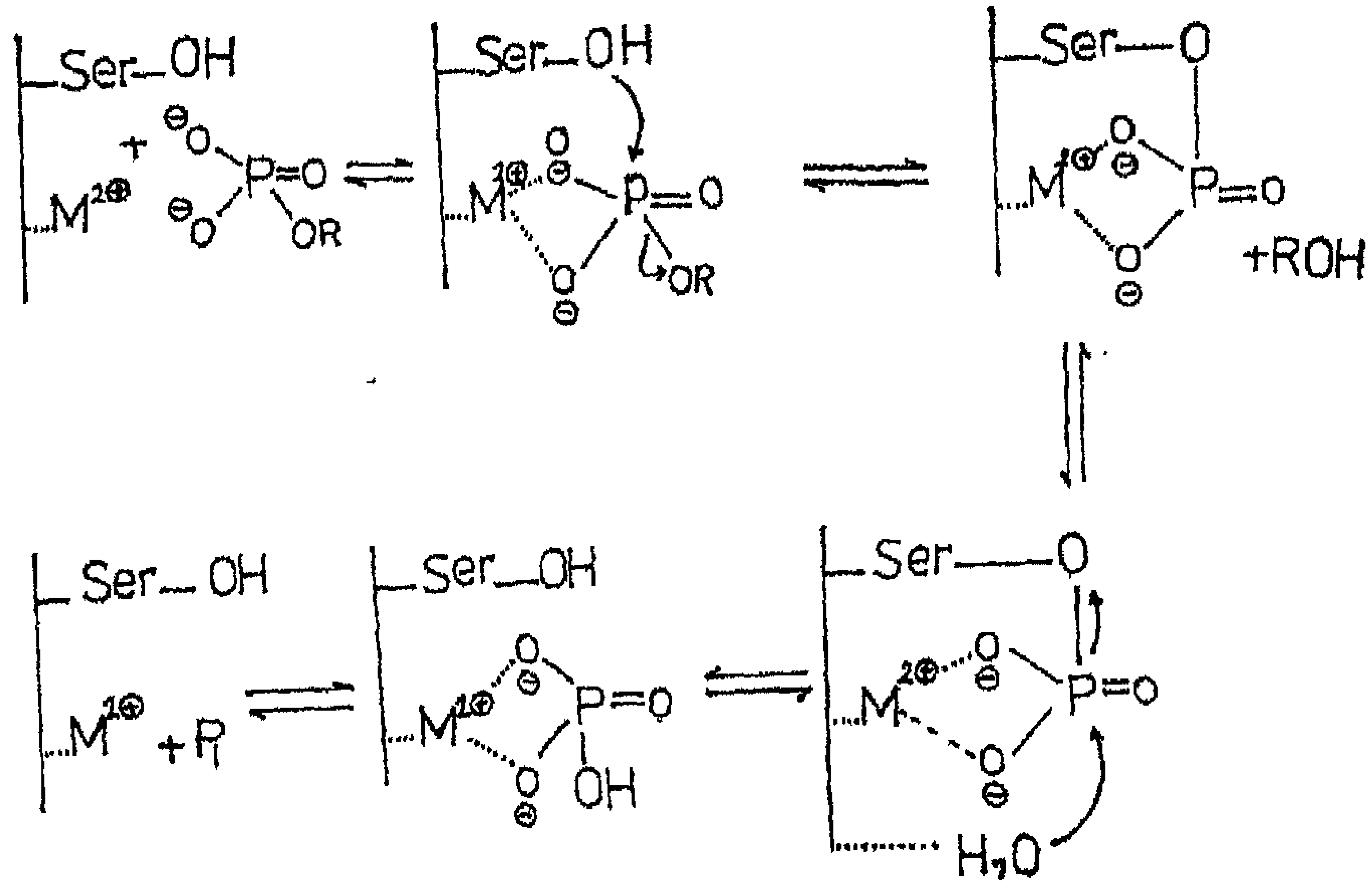
و Borate و Carbonate. ويحتوي عدد منها على أيون الزنك فيما يوجد Fe^{+2} أو Mn^{+2} أو Mg^{+2} في بعضها الآخر.

إن أحسن الدراسات التي جرت حول أنزيم الفسفاتاز القاعدي تناولت أنزيم البكتريا E.Coli ذي الوزن الجزيئي 80000. يحتوي هذا الأنزيم على أيونين من الزنك Zn+2 ويثبط بالمركب ثنائي ايزوبروبيل فلوريد الفسفات DEP، يتجزأ الأنزيم إلى دون وحدتين Subunits غير نشطتين بوزن جزيئي 40.000 عند معاملة الأنزيم بالحامض Thioglycolic و 6 مولار يوريا، ويسترجع الأنزيم نشاطه عند إزالة اليوريا عن طريق الديلزة Dialysis أو بواسطة كروماتوكرافي الترشيح الهلامي Gel Filtration أو عند ترك الأنزيم في الهواء حيث يعاد تكوين الأواصر (-S-S-). ويمكن توضيح الآلية العامة لأنزيم الفسفاتاز القاعدي لبكتريا E.Coli في المعادلة (2-43) إذ يتكون معقد الأنزيم- الركيزة الذي يتفكك لإعطاء الأنزيم المثبط تساهمياً بمجموعة الفسفات، والمركب العضوي الكحولي. وعند التحلل المائي، تتحرر مجموعة الفسفات والأنزيم بصيغته الأصلية.



(43-2) ...

ويمكن تفصيل آلية التفاعل في الشكل (2-35). تلمح هذه الآلية إلى تأثر ثمالة حامض الفسفورك للركيزة مع الأيون الموجب ثنائي التكافؤ في الموقع النشط للأنزيم (المعقد I). يتبع ذلك هجوم نيوكليوفيلي Nucleophilic على ذرة الفسفور من قبل أوكسجين مجموعة الهيدروكسيل لثمالة السرين في الموقع النشط.



شكل (2- 35) الألية المقترحة للفعل التحفيزي لانزيم الفسفاتاز القاعدي.

يتضح التخصص الواسع لأنزيم البكتريا E.Coli في الجدول (2-12) يكمن التخصص الحقيقي الوحيد للأنزيم في ثمالة الاورثوفسفات المرتبطة إلى الجزء العضوي للركيزة بآصرة C-O-P ولا يحلل الأنزيم مائياً الآصرة N-P أو الميتافسفات Metaphosphate أو ثنائي الفسفات Diphosphate

جدول (2-12) النشاط النبسي لأنزيم الفسفاتاز القاعدي للبكتريا **E.Coli** تجاه الركائز الفسفاتية المختلفة

السرعة النسبية	الركيزة	السرعة النسبية	الركيزة
1.3	Uridine phosphate	1.0	p-Nitrophenyl phosphate
0.7	Riboflavin 5- phosphate	0.9	β- Glycero- phosphate
0.9	L- Histidinol phosphate	0.9	Glucose 1- phosphate
صفر	Creatine phosphate	1.0	Adenosine 3- phosphate

السرعة النسبية	الركيزة	السرعة النسبية	الركيزة
صفر	Adenosine triphosphate	0.8	Adenosine 5- phosphate
صفر	Sodium pyrophosphate	1.2	Cytidine phosphate
		1.0	Guanosine phosphate

طرق قياس نشاط أنزيمات الفسفاتاز القاعدية والحامضية

هناك عدة طرق لتعيين النشاط الأنزيمي وأهمها:

1- إستعمال P-Nitriphenyl phosphate بمثابة ركيزة ثم قياس معدل سرعة تكوين p-Nitrophenol بطرق طيفية (عند طول موجي 340 نانوميتر) إذا كان الرقم الهيدروجيني أقل من 7 وعند 400 نانوميتر إذا كان أكبر من 7).

2- قياس معدل سرعة تكوين الاوثوفسفات بإستعمال طريقة Fiske و Subba Raw (أو بطرق مماثلة) وتستخدم فسفات الفنيل phenyl phosphate أو Glycerophsphate وهي مواد غير مولدة للأصباغ Non- chromogenic بمثابة ركائز للأنزيم.

3- استعمال Naphtyl phosphate وقياس معدل سرعة تحرر المركب Naphthol وذلك بربطه مع الأصباغ مثل مشتقات ديازو Diazo للنفثيل امين Naphthyl O-Dianisidine Amine و Benzidine و Paranitroaniline

الإستخدامات التطبيقية لأنزيمات الفسفاتاز

1- يثبط أنزيم الفسفاتاز الحامضي بشدة بأيون الفلوريد (F) ولهذا يستخدم الأنزيم لتقدير الكميات الصغيرة جدا من الفلوريد في مياه الشرب.

2- يوجد الفسفاتاز الحامضي والقاعدي سوية في كثير من الأغذية كالحليب ويستخدم الفسفاتاز القاعدي (الرقم الهدروجيني الأمثل 9-10) للكشف عن معاملة الحليب بالحرارة إذ يتلف عند تسخين الحليب لمدة 30 دقيقة بدرجة

حرارة 36-37°م. كما يوجد الفسفاتاز القاعدي في الأحياء المجهرية التي تنمو على منتجات الحليب مثل الجبن (إذ يلاحظ تكون طبقة على السطح نتيجة لنموالأحياء المجهرية)، ويمكن التمييز بينه وبين أنزيم الحليب من حيث مقاومته للحرارة فأذا اظهر الحليب المعامل بالحرارة (كما ذكر أعلاه) فعالية أنزيم الفسفاتاز القاعدي فأن هذا يدل على تلوثه.

3- يوجد أنزيما الفسفاتاز القاعدي والفسفاتازالحامضي في البيض ويكون للأخير نشاط أعلى. تحرر أنزيمات الفسفاتاز مجاميع الفسفات في البيض المخزون لمدة طويلة وربما تحرر الفسفات من البروتينات الفسفاتية لذا فإن كمية حامض الفسفوريك الذائب في الماء يحدد فترة خون البيضة بعد الإنتاج وبكلمة أخرى يميز البيضة الطازجة من غير الطازجة.

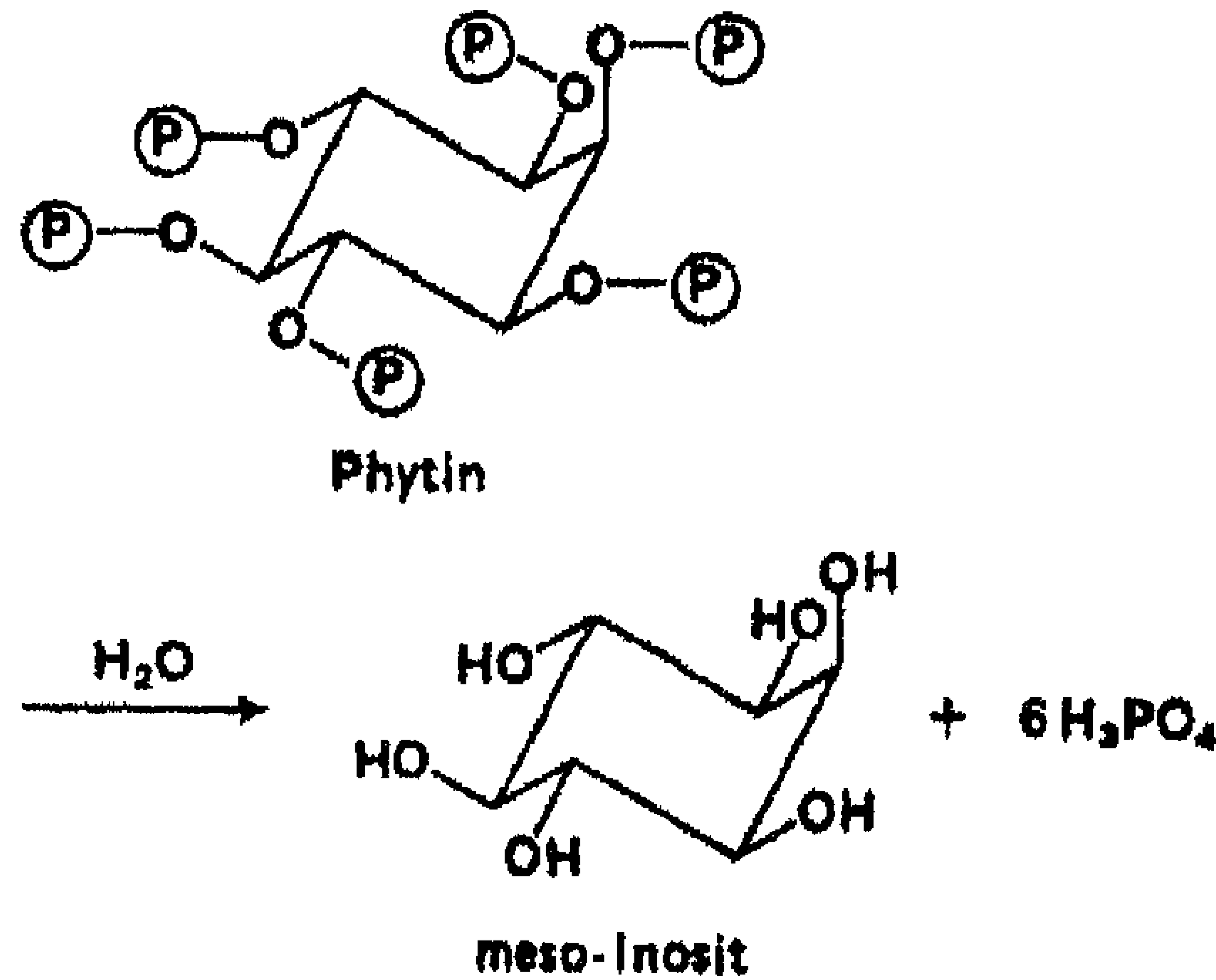
أنزيمات الفسفاتاز المتخصصة لأحاديات أستر الفسفات

Specific phosphoric monoesterases

على العكس من أنزيمات الفسفاتاز الحامضية والقاعدية، هناك أنزيمات فسفاتاز متخصصة لأحاديات الاستر الفسفاتية ويظهر تخصصها للجزأين الكحولي والفسفاتي لجزيئة الركيزة. تمتلك هذه الأنزيمات عادة رقماً هيدروجيناً أمثل يتراوح بين 6 و8. وتشمل هذه المجموعة من الأنزيمات على أنزيم Glucose-6 phosphatase و Glucose-1 phosphatase و Hoxose diphosphatase و 5-Nucletotidase و 3-Nucleotidase. ويحفز الاخيران التحلل المائي لمجموعة الفسفات من 3 و ٥- ريبونيوكليوتيدات الناتجة عن التحلل المائي الأنزيمي Phosphoric diester hydrolase للحامض RNA.

هناك أنزيم آخر ذو خصوصية واطئة للتحلل المائي لأحادي أستر الفسفات وذو أهمية خاصة للكيمياوي الغذائي ويسمى أنزيم الـ Phytase إذ يعمل على الركيزة phytin (معادلة 2-449) واسعة الإنتشار في النباتات وقد يعمل (أي

لفايتين) بمثابة الخازن للفسفات، إذ تبلغ نسبتها فيه حوالي 70٪ في القمح. ومن لناحية الغذائية يكون الفايتين غير مرغوب فيه حيث يمنح إمتصاص لكالسيوم من الأمعاء.

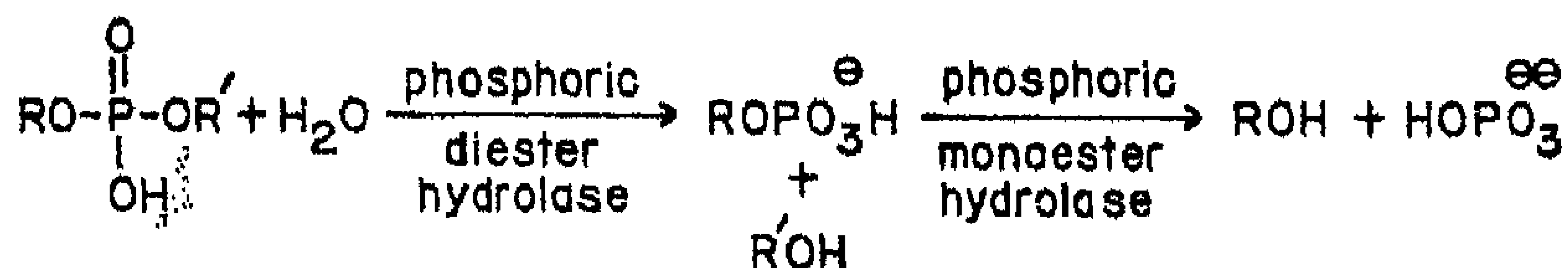


(44 -2) ...

2-5-8-٤ أنزيمات التحلل المائي لثنائي أستر الفسفات

Ec. 3.1.4. Phosphoric diester hydrolases

تحلل مائياً هذه المجموعة من الأنزيمات آصرة واحدة أو آصرتي إستر فسفاتيتين كما في المعادلة الآتية (2-45):

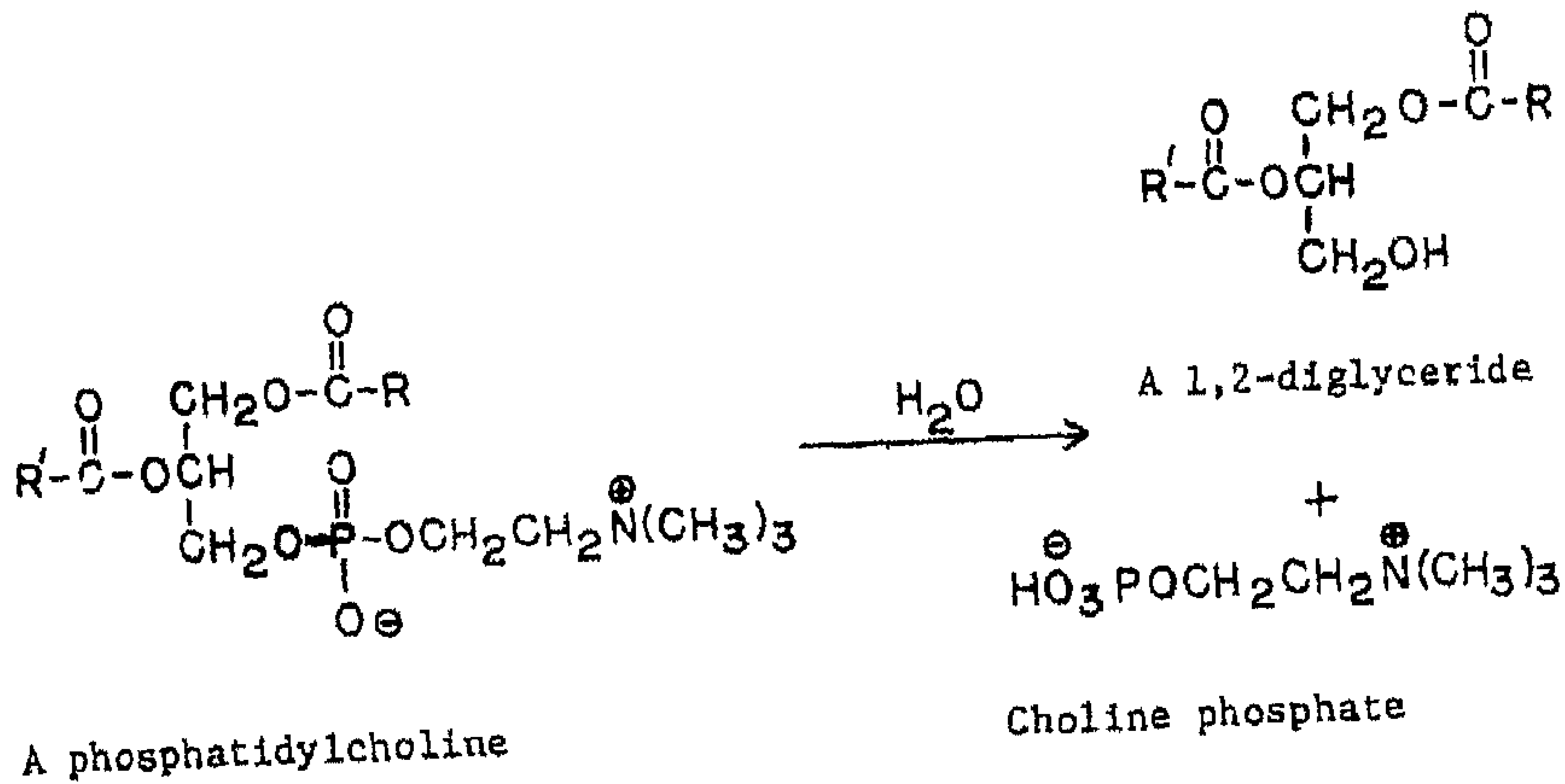


(45 -2) ...

من الممكن نظريا التمييز بين هذه المجموعة من الأنزيمات وأنزيمات التحلل المائي لأحادي أستر الفسفات بإستخدام الركيزتين phenyly phosphate و Diphenyl Phosphate إلا أنه لا تعمل جميع أنزيمات المجموعة الواحدة على هاتين الركيزتين.

من أهم أنزيمات هذه المجموعة، أنزيمات التحلل المائي للأحماض النووية والأنزيمات المحللة لأواصر معينة ثنائية أستر الفسفات للشحوم الفسفاتية وكمثال الأنزيم phos pholipase C– المحفز للتحلل المائي لمركب اللسثين Lecithin, phosphatidyl choline

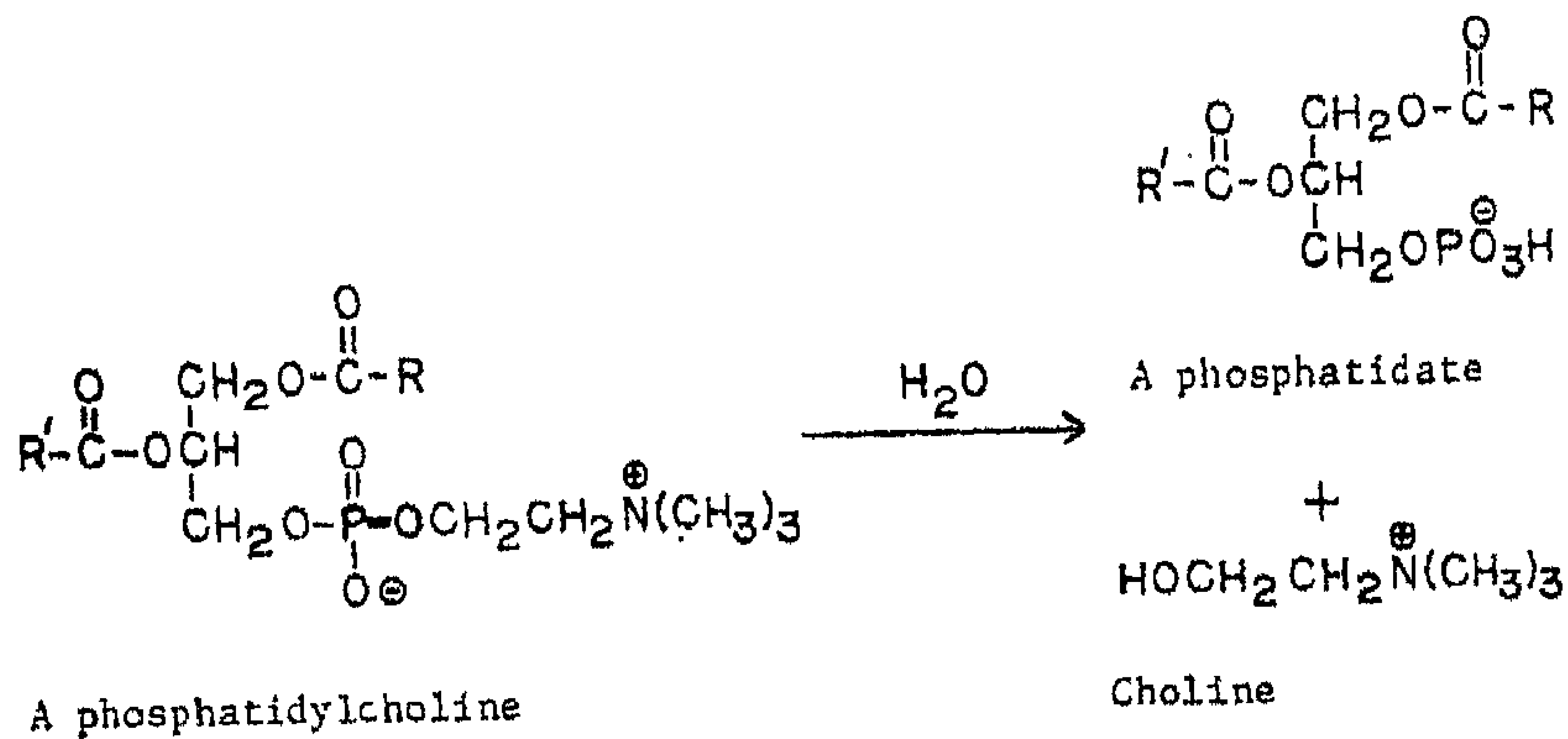
كما في المعادلة الآتية:



(46 -2) ...

ويتضح من المعادلة تخصص الأنزيم الاستر المتكونة بين مجموعة الفسفات ومجموعة الهدروكسيل للكلسيرول.

يحفز الأنزيم phospholipase D التحلل المائي لمركب اللسثين أيضاً (معادلة 2–47)، إلا أنه يعمل على آصرة الاستر الناتجة من مجموعة الفسفات من جهة ومجموعة الهدروكسيل لثمالة الكلولين Choline residue من جهة أخرى، ولا يستطيع أي من الأنزيمين أن يقوم بالفعالية التحفيزية للآخر.



(47 -2) ...

2-8-5-3 أنزيم التحلل المائي لثلاثي أستر الفسفات

Triphosphoric monoester hydrolases Ec. 3.1.5

يحفز الأنزيم (Deoxy-GTp nucleotidohydrolase d GTPase) التحلل المائي للمركب dGTP (وأيضاً GTP) مؤدياً إلى تكوين ديوكسي الكوانوسين وثلاثي الفسفات (معادلة 2-48).


Deoxyguanosine triphosphate + H_2O $\rightleftarrows$ Deoxyguanosine + Triphosphate

2-8-6 أنزيمات الكلايكوسيداز Glycosidases والكلايكاناز Glycanases

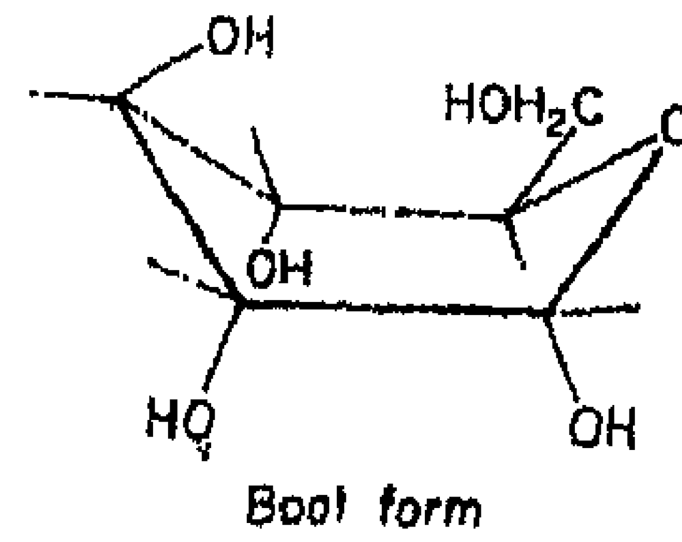
تحفز هذه الأنزيمات تفاعلات التحلل المائي لقليلات السكريد oligosaccharides والكلايكوسيدات Glycosides وعديدات السكريد وتقسم نسبة إلى خصوصيتها كما في الجدول (2-13).

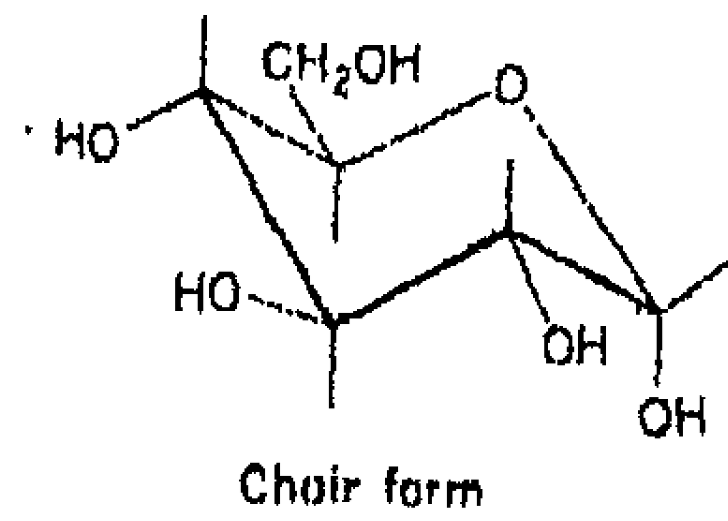
جدول (2-13) تصنيف وتخصيص أنزيمات الكلايكوسيداز والكلايكاناز

لأنزيم	رقم الشفرة النظامي	التخصص للأصرة	أمثلة للركائز
(A) Glucosidases α - D-Gluco-sidase	3.2.1.20	α-D-Glucopyranosyl	مالتوز، سكروز Maltose, sucrose
β - D-Gluco sidase	3.2.1.21	β-D-Glucopyranosyl	سالسين، جينتيوبيوز، سيلوبيوز Salicin, Gentiobiose, Cellobiose
α- D- Galac-tosidase	3.2.1.22	α-D-Galaktopyranosyl	رافنوز، ميليبيوز Melibiose, Raffinose
β- D- Gal-actosidase	3.2.1.23	β-D-Galaktopyranosyl	لاكتوز Lactose
β- D-Fru-ctofuran- osidase	3.2.1.26	β-D- Fructofuranosyl	رافنوز، سكروز Sucrose, Raffinose
(β) Glycanases α- Amylase	3.2.1.1	يحلل مائياً الأواصر الكلايكوسيدية ألفا 1←4 في عديدات السكريد الحاوية على 3 أو أكثر	Starch, Glycogen

أمثلة للركائز	التخصص للأصرة	رقم الشفرة النظامي	لأنزيم
Starch, Glycogen	من أواصر ألفا← 4 لوحدات دي كلوكوز يحلل مائياً أواصر الكلايكوسيدية ألفا 1 ← 4 لعديدات السكريد بحيث يزيل وحدات مالتوز متعاقبة من الجهة غير المختزلة السلسلة	3.2.1.2	β- Amla- se
starch ،Glycogen	كما في β-Amylase إلا أنه يزيل وحدات كلوكوز	3.2.1.3	Glucoamylase
Inulin	يحلل مائياً أواصر الفركتان بيتا 1←2	3.2.1.7	Inulase
Cellulose	الأواصر بيتا 1←4 كلوكان	3.2.1.4	Cellulase
Pectate, other Polygalacturon- ides	يحلل مائياً الأواصر-α- 1.4 D Galacturonide	3.2.1.15	Polygactu- ronidase

تعتمد خصوصية الأنزيم glycosidases بصورة عامة على حجم حلقة الكلايكون Glycone والتوزيع الفراغي للهدروكسيل الكلايكوسيدي Glycosidic hydroxyl وأما الاختلافات الأخرى خارج الحلقة وكمثال وجود أو عدم وجود ذرة الكربون رقم 6 وطبيعة الاكلايكون Aglycone. كأن يكون كحول أوفينول – فأنها تؤثر في سرعة تكسر الاصرة الكلايكوسيدية ولكن لا تؤثر في التخصص الأنزيمي. وعلى سبيل المثال، يمكن أن توجد أحاديات السكريد الخماسية أو السداسية. بشكل الكرسي chair أو Boot كما في الشكل (2-36).

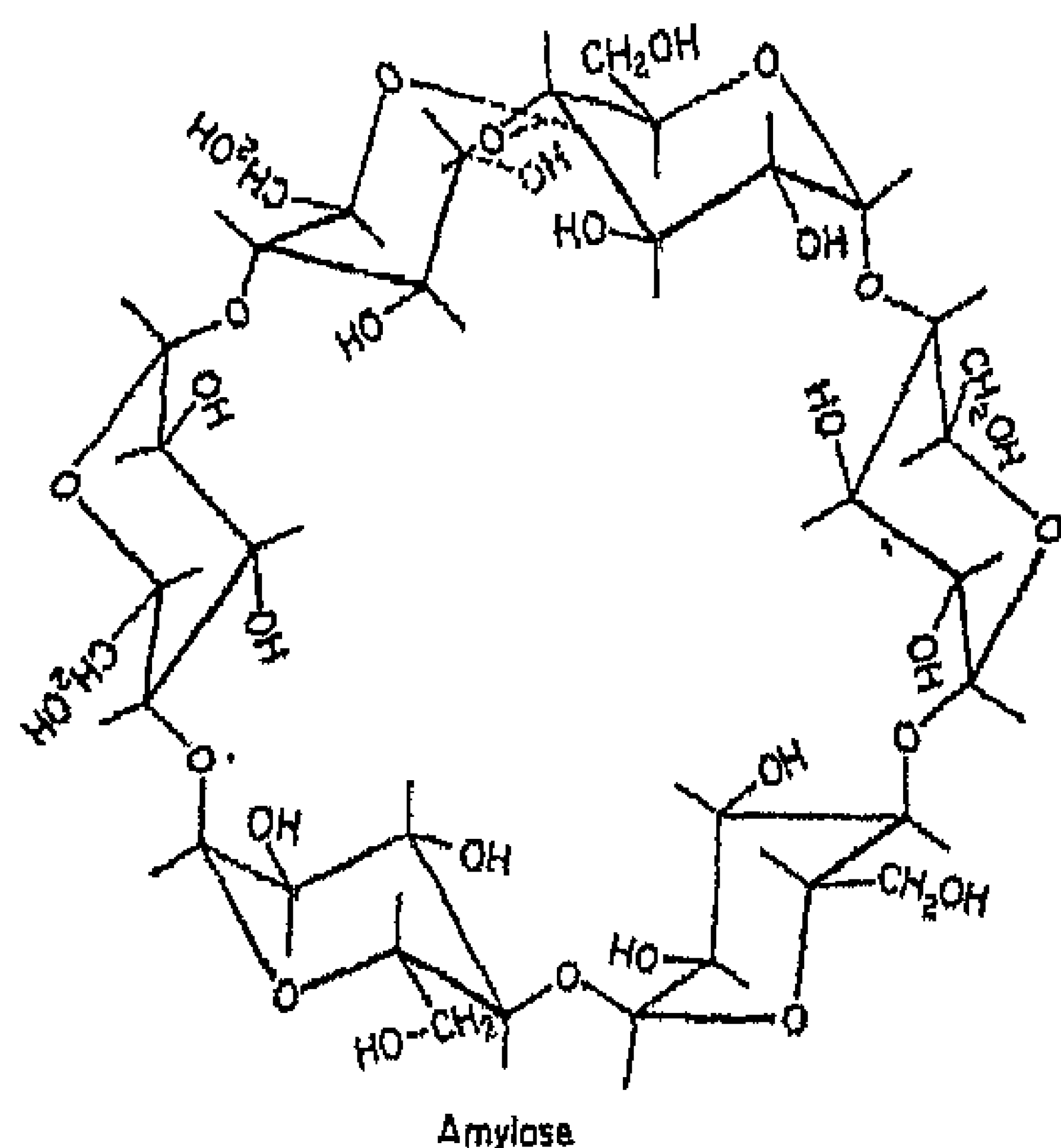


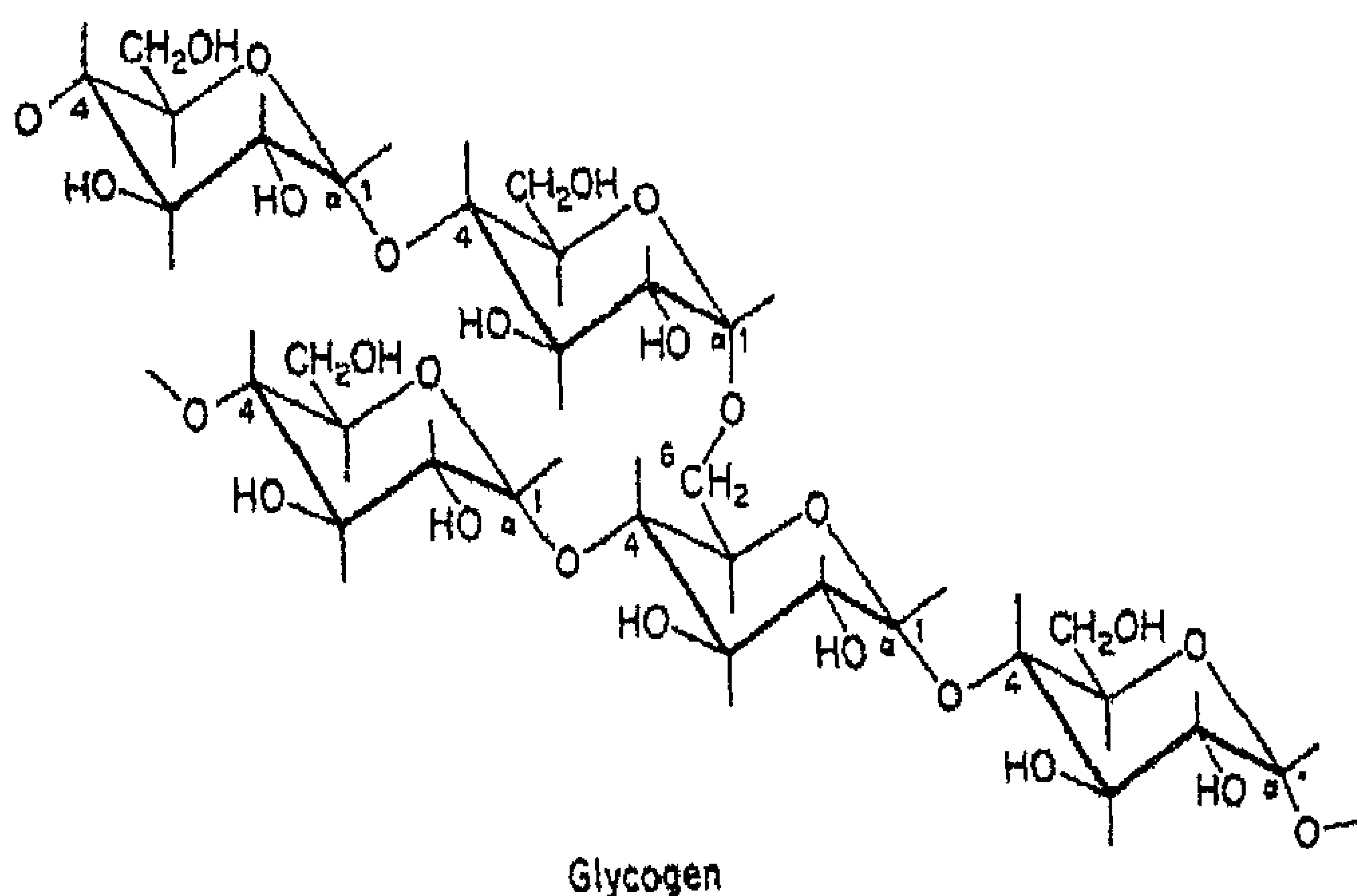


هيئة الزورق   هيئة الكرسي

شكل (2- 36) هيئة الكرسي والزورق للمركب $\alpha - D - Glucose$

أما في الكلايكوسيدات (الكلايكوسيد مركب ينتج عن معاملة أحادي السكريد مع الكحول في محيط حامضي) فأن هيئة الكرسي تمثل الصيغة التي توجد فيها هذه المركبات في الطبيعة ويظهر بأن أنزيمات الكلايكوسيداز متخصصة لهيئة الكرسي. كما أن لحجم جزيئة الركيزة دور مهم في عمل الأنزيم فنجد مثلاً الأنزيمات α- Amylases و β - Amylases و 1.6 -glucosides - Amylopectin فعالة مع الجزيئات الكبيرة مثل النشأ والكلايكوجين ولكنها ضعيفة الفعالية مع المالتوز والايزمالتوز Esomaltose. يكون أنزيم السليولاز Cellulase فعالاً مع السليلوز ولكنه غير فعال تجاه السلوبيوز Cellobiose ويمثل الشكل (2-37) طبيعة هذه الجزيئات البوليمرية. كما أن النشا والكلايوجين أو السليلوز لا يتحلل مائياً بالأنزيمات Maltase أو Cellobiase على التوالي ولتفسير هذه الظاهرة إفترض بأن الحجم الكبير لهذه الجزيئات لا يسمح بإرتباطها في الموقع النشط للأنزيم Maltase أو Cellubiase وأما المالتوز والسلوبيوز فإنها تعمل بمثابة مثبطات تنافسية لأنزيم الإميلاز والسليولاز على التوالي لأسباب واضحة.



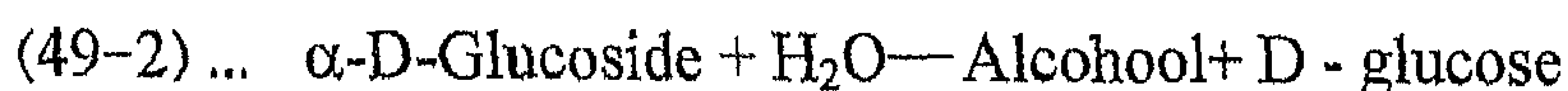


شكل (2- 37) تركيب الأميلوز و الكلايكوجين والسليلوز. الأميلوز بوليمر على شكل حلزون وتحتوي اللفة الواحدة على حوالي ست وحدات كلوكوز. السليللوز سلسلة مستقيمة تجعل بالإمكان تكوني أواصر هدورجينية بين السلاسل المتجاوزة.

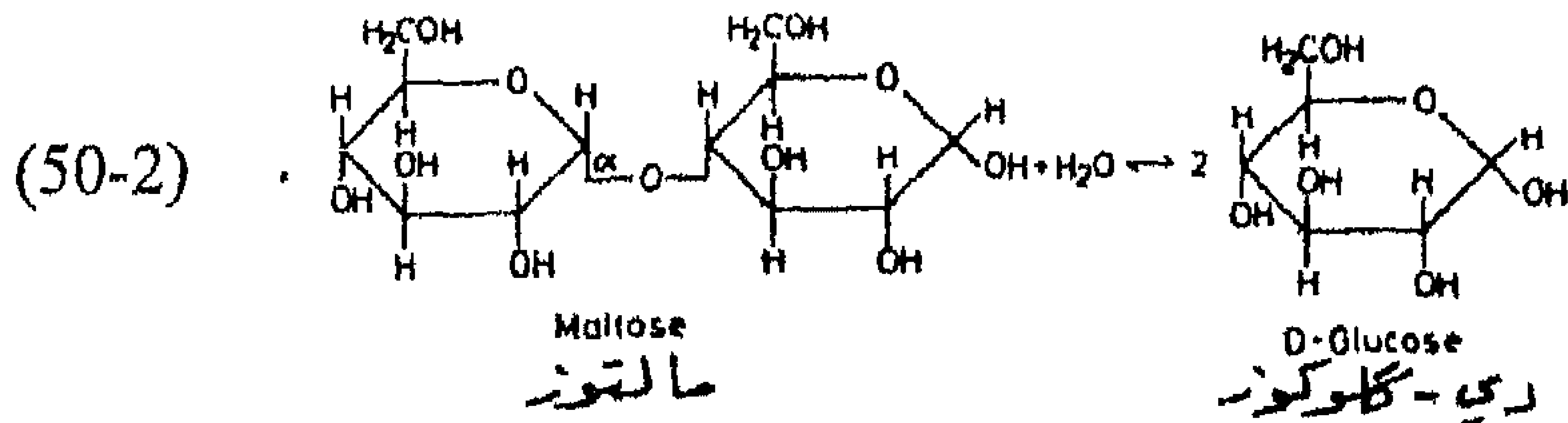
1-6-8-2

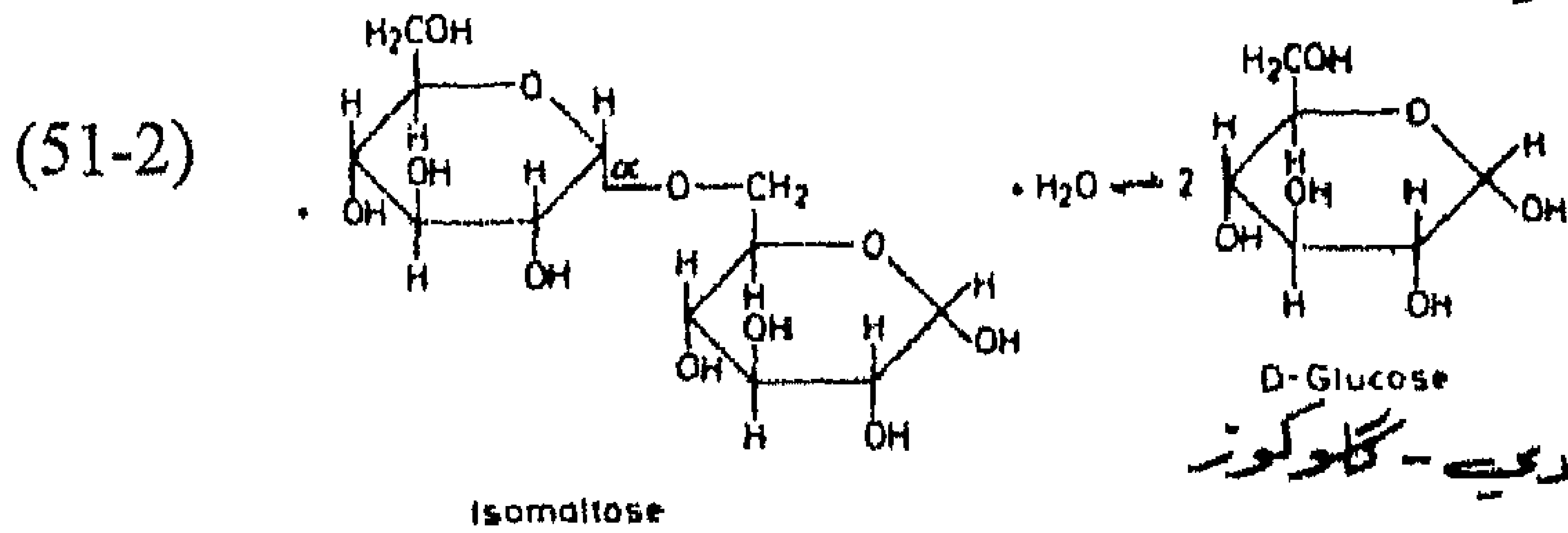
α-D-Glucosidase (α-D-Glucoside glucohydrolase, EC.32.1. 20

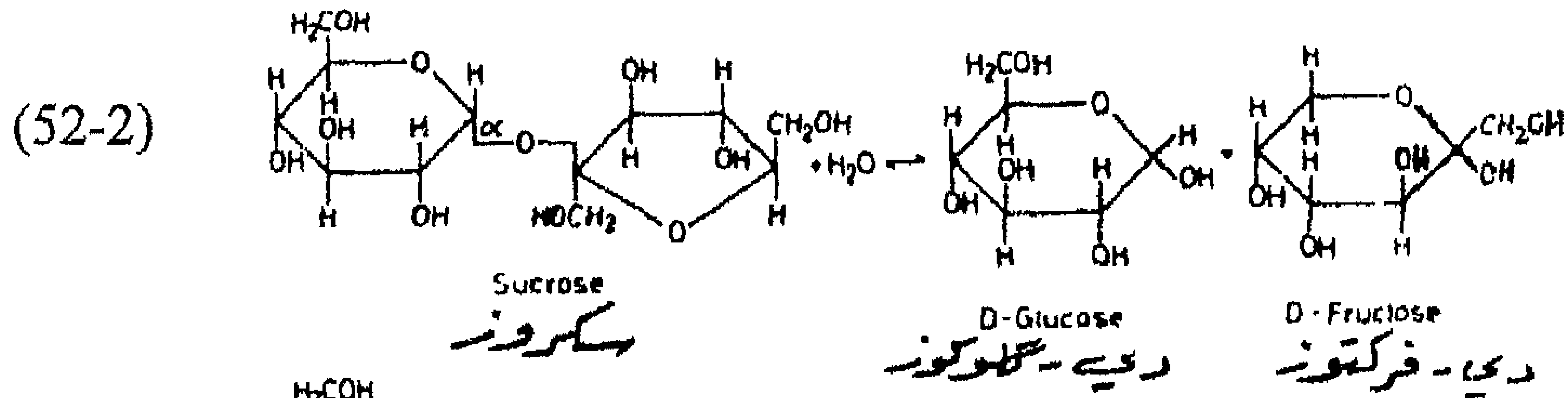
يحفز الأنزيم التحلل المائي للمركبات α-D -Glucosides كالآتي:

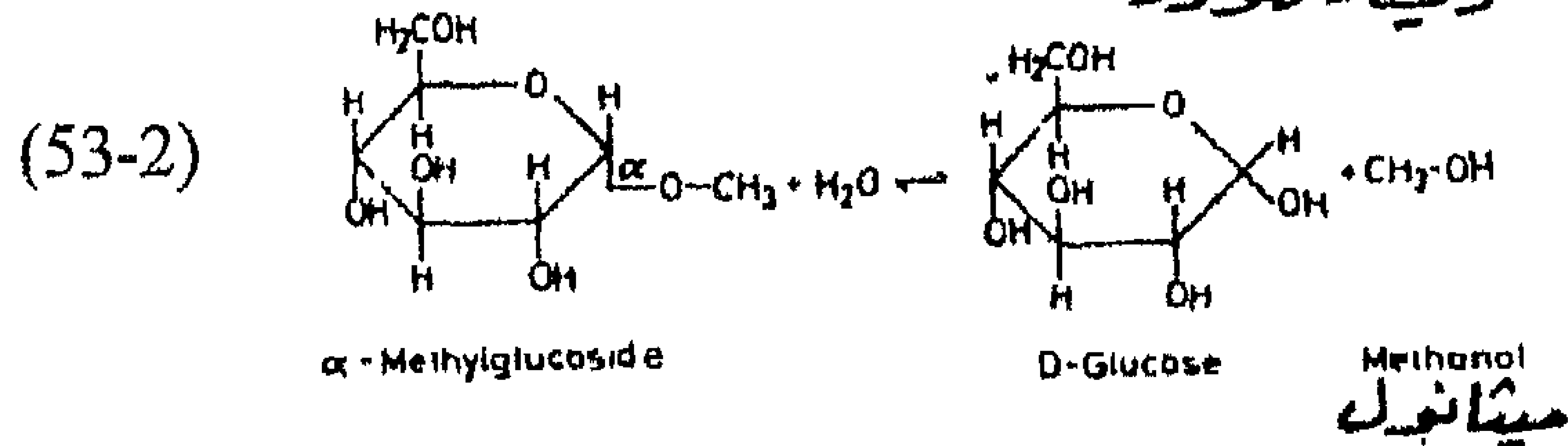

(49-2) ... α-D-Glucoside + H_2O— Alcohool+ D - glucose

ويعمل على عدد من الركائز الطبيعية وغير الطبيعية ومنها Maltose وIsomaltase و Sucrose و α-Methylglucoside كما في المعادلات الآتية:

(50-2)


(51-2)


(52-2)


(53-2)


وينتشر الأنزيم بصورة واسعة في الحيوانات والنباتات الراقية وفي الأحياء المجهرية. يوجد في الخميرة Saccharomyces cervisiae نوعان من أنزيم α-Glucosidase الأول Maltase ويحلل مائياً المالتوز والسكروز ولكنه لا يحلل Isomaltose أو α-Methylglucoside وأما الأنزيم الثاني α-Methyl glucosidase فيحفز التحلل المائي للمركب α-Methylglucoside و

Isomaltose و Sucorse ولكنه غير فعال تجاه المالتوز. يوضح الجدول (2-14) السرع النسبية للتفاعل بوجود الركائز المختلفة.

جدول (2-14) السرع النسبية للتفاعلات المحفزة بأنزيم الـ Maltase و α- Methyl Glucosidase بوجود الركائز المختلفة

الركيزة	الأنزيم	
	Maltase	α-Methylglucosidase
Maltse	1.00	صفر
Sucrose	0.67	0.73
α- Methylucoside	—	1.00
Isomaltose	—	1.40

قياس فعالية الأنزيم الفا- كلوكوسيداز α-Glucosidase

يستحسن استخدام المالتوز بمثابة ركيزة عند تعيين نشاط الأنزيم Maltase ثم قياس الكلوكوز الناتج بطريقة أنزيمية وكمثال باستخدام ATP/Hexokinase و NADP+ /Glucose-6- phosphate dehydrogenase إذ يتحول الكلوكوز بتحفيز أنزيم الهيكسوكيناز Hexokinase إلى Glucose-6- phosphate ثم يتفاعل الأخير مع NADP+ بوجود الأنزيم Glucose-6- phosphate dehydrogenase (G_6PDH) :


(54-2) ...Glucose +ATP $\xrightarrow{\text{Hexokinase}}$ Glucose—6—phosphate+ADP

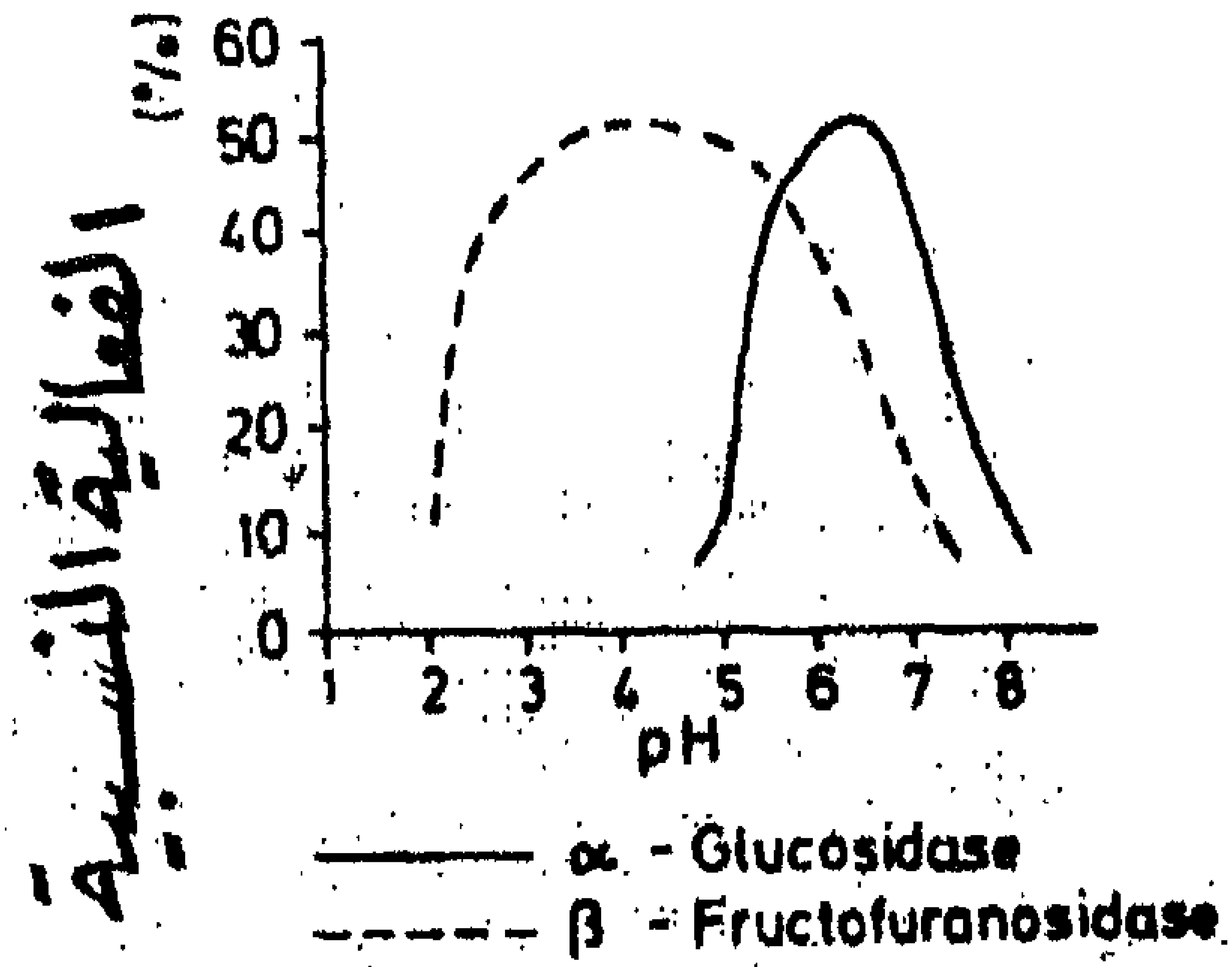

(55-2) ...Glucose - 6 phosphate + NADP $\xrightarrow{G_6PH_7}$ 6-phosphogluconate + NADPH + H++

يلاحظ من المعادلتين أعلاه تكوين جزيئة NADPH لكل جزيئة كلوكوز ويمكن قياس تركيز المركب NADPH الناتج باستخدام المطياف

وقياس الكثافة البصرية عند الطول الموجي 340 نانوميتر إذ توازي الزيادة في تركيز NADPH(زيادة الإمتصاص)، النشاط الأنزيمي.

يمكن استخدام p-Nitro phenyl α-D-glucopyranoside بمثابة ركيزة للأنزيم α-Glucosidase ويتكون نتيجة للتفاعل، المركب P-Nitro phenol ذو اللون الأصفر في المحيط القاعدي (نتيجة لتكوين الأيون p-Nitrophenolate).

الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم α-Glucosidase من الخميرة يقع في حدود 7.0 (شكل 2-38).



شكل (2- 38) العلاقة بين الفعالية الانزيمية والرقم الهدروجيني (-) الانزيم $\alpha - D - Glu\cos e$ (...) الانزيم $\beta - Fructofuranosidase$

أهمية الأنزيم Glucosidase-

يلعب الأنزيم Maltase الموجود في الخميرة . دورا كبيرا في مراحل التخمر إذ يؤدي تحول المالتوز –الناتج عن تحلل النشأ بفعل أنزيمات الاميلاز– إلى الكلوكوز ويتحول الاخير بواسطة مجموعة من الأنزيمات موجودة عادة في الخميرة إلى CO_2 وايثانول .

β-D-Glucoside glucohydrolase.EC3.2.1.21 2-6-8-2

يحفز التحلل المائي للمركبات β-D- Glucosides

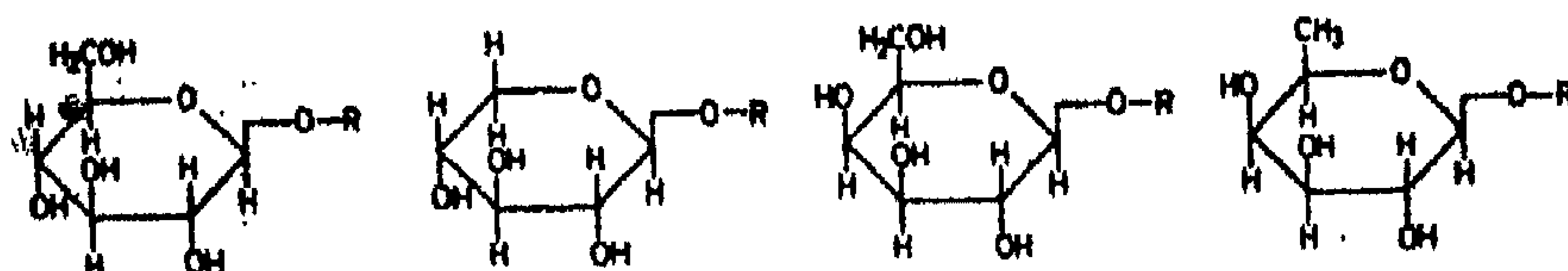


(56-2) ...β-D- Glucosides+ H_2O ⇄ Alcohol+D-Glucos

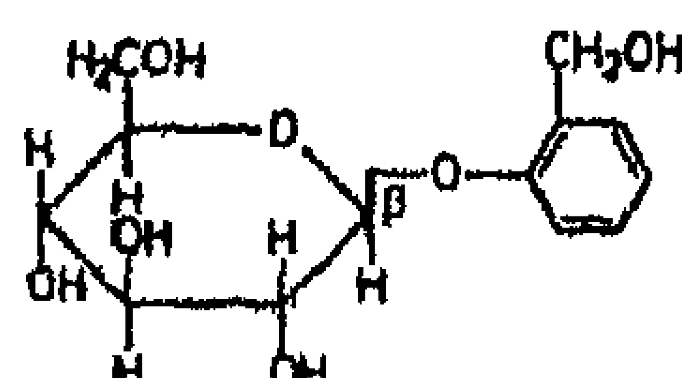
ويوجد في النباتات أو الحيوانات الراقية والاحياء المجهرية هناك نوعان من الأنزيم β - Glucoside يختلفان في تخصصهما للركيزة .

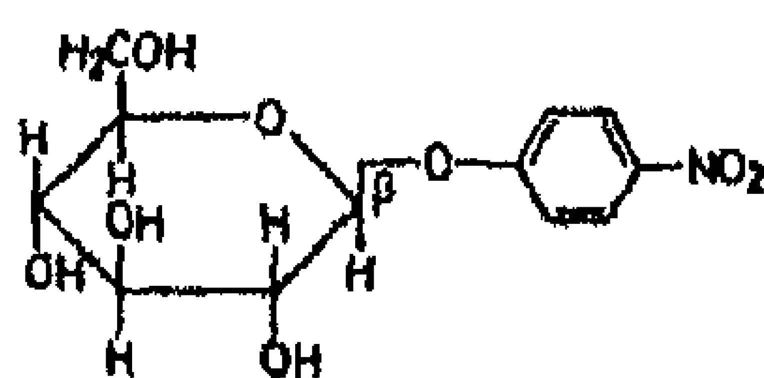
الأول Aryl-β-Giucosidase ويوجد في اللوز والثاني β-1.4-Glucodimerase ويحلل الأواصر الكلايكوسيدية من نوع بيتا كالتي تربط بين ثمالات الكلوكوز في مركب السليلوز، وسوف نتناول هنا النوع الاول فقط .

تعمل الأنزيمات Aryl-β- Giucosidase على الركائز من نوع Aryl- glucosides بصورة رئيسية كما أنها تعمل أيضا عل الركائز Alkyl- glucosides ولكنها تفضل الاول على الثانية . ويظهر بأن الأنزيم الموجود فى اللوز مسؤول كليا عن التحلل المائي للمركبات β-D-Fucosides و β-D-Galactosidesβ-D- Galactosides β-D- Glucosides أما



خلاصة الشعير المنبت Malt فأنها تحوي على نشاط أنزيمين مختلفين تماما وهما β-Galactosidase و β-Glucosidase يتراوح الرقم الهيدروجيني الامثل للأنزيم β-Galactosidase بين 4و6 تبعا لمصدر الأنزيم بصفة خاصة بركبات اللاكتون وكمثال Glucono-1.5-lactone و Glucono-1.4-lactone وحامض الاسكوربيك L-Ascorbic .يتم الكشف عن نشاط الأنزيمات Aryl-β- Giucosidase باستخدام O(orp) Nitrophenyl-β-D- glucosides أو Salicin بمثابة ركائز .



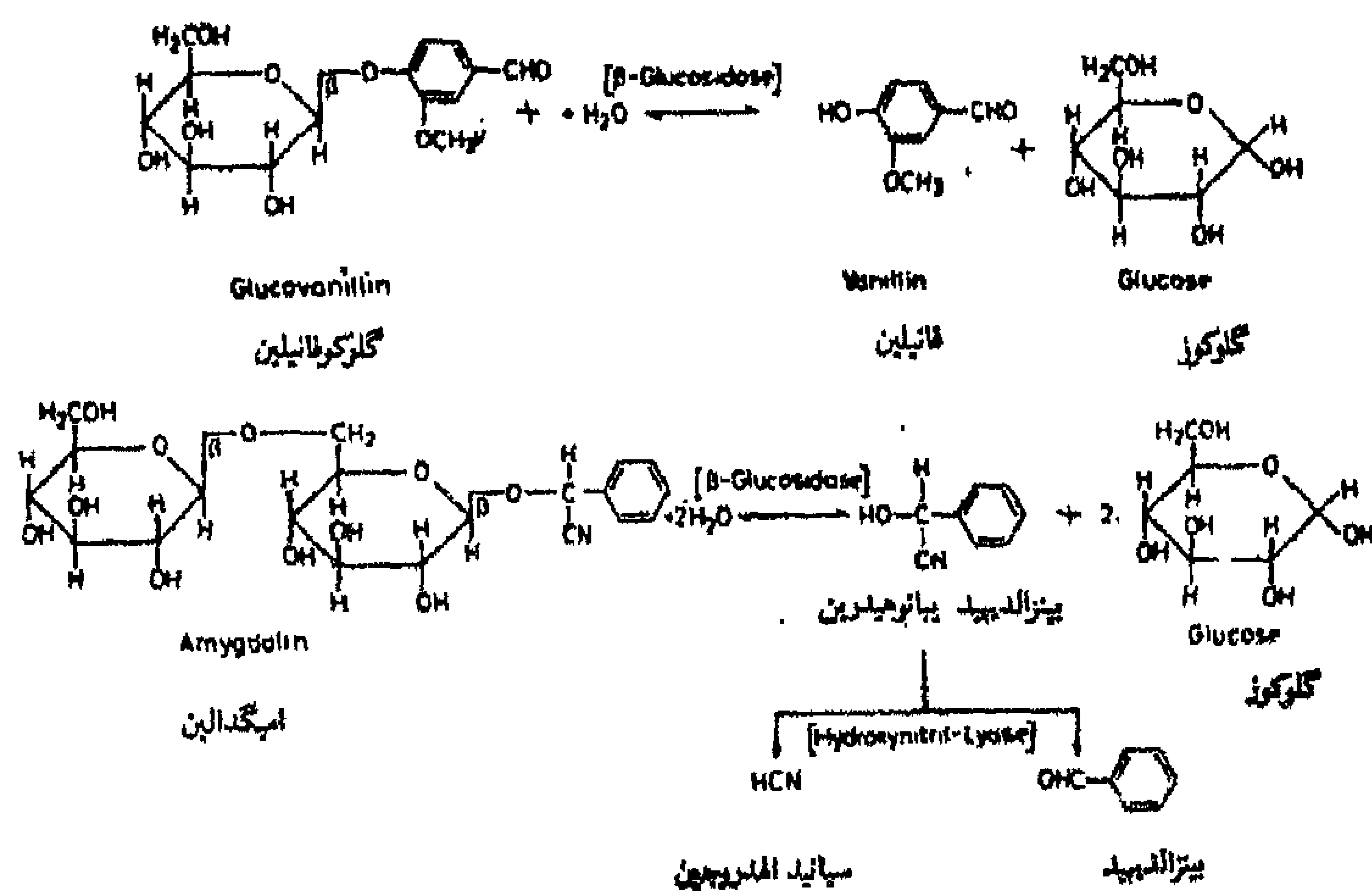


P-Nitrophenyl-β-D-glucopy anoside

Salicin

وفي كلتا الحالتين يمكن تعيين الكلوكوز المتحرر باستخدام اقتران أنزيمي Hexokin-asel/ATP و $NADP^+$ dehyrogenase/ lucose-6-phosphate وكما ذكر لأنزيم α- Glucosidase .

يلعب الأنزيم Aryl-β- Giucosidase دورا مهما في التصنيع الغذائي إذ يحرر موادا ذات نكهة خاصة مثل الفانيلين Vanillin والاميكدالين Amygdalin كما في المعادلتين الاتيتين .

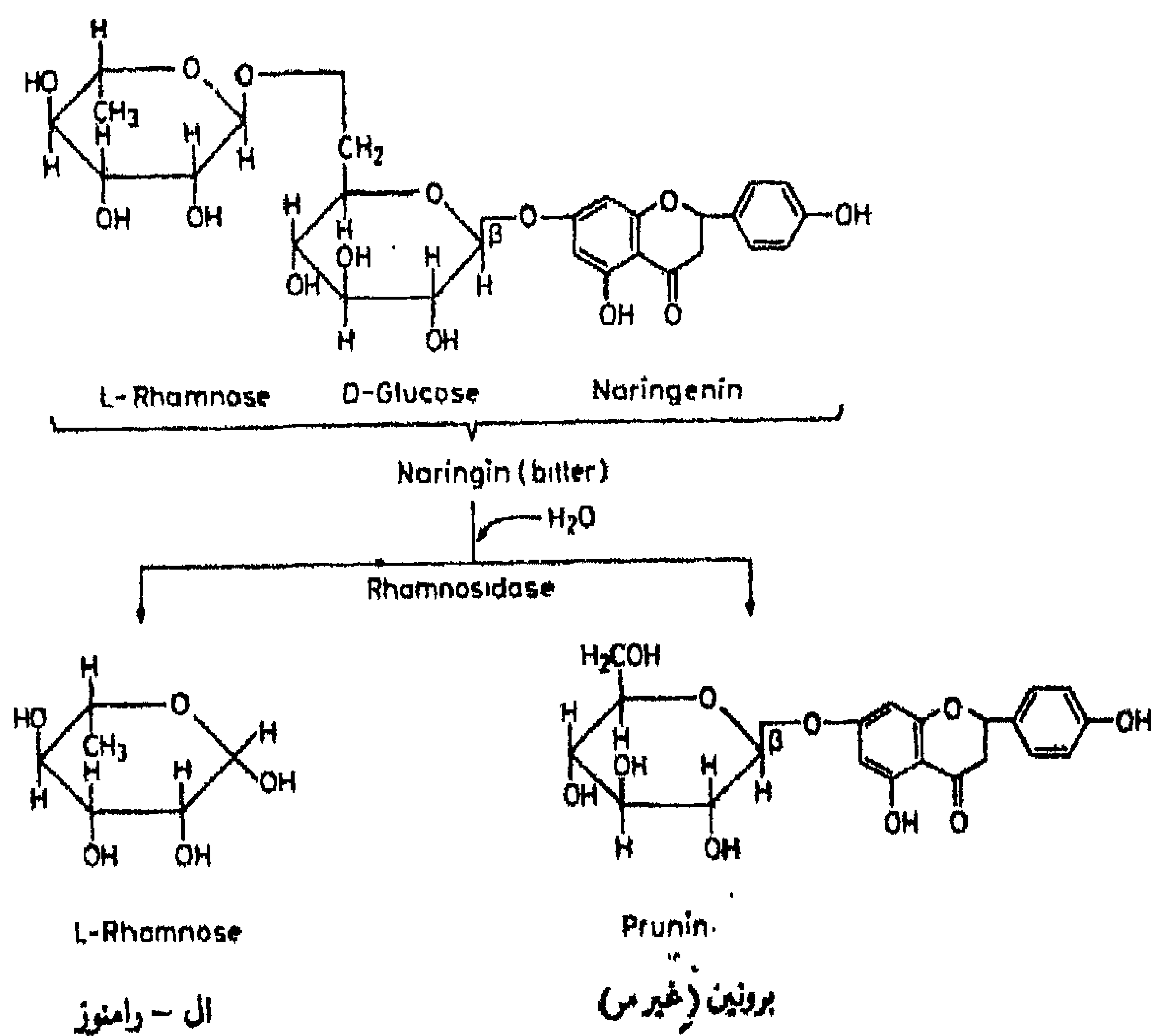


(58 -2) ...

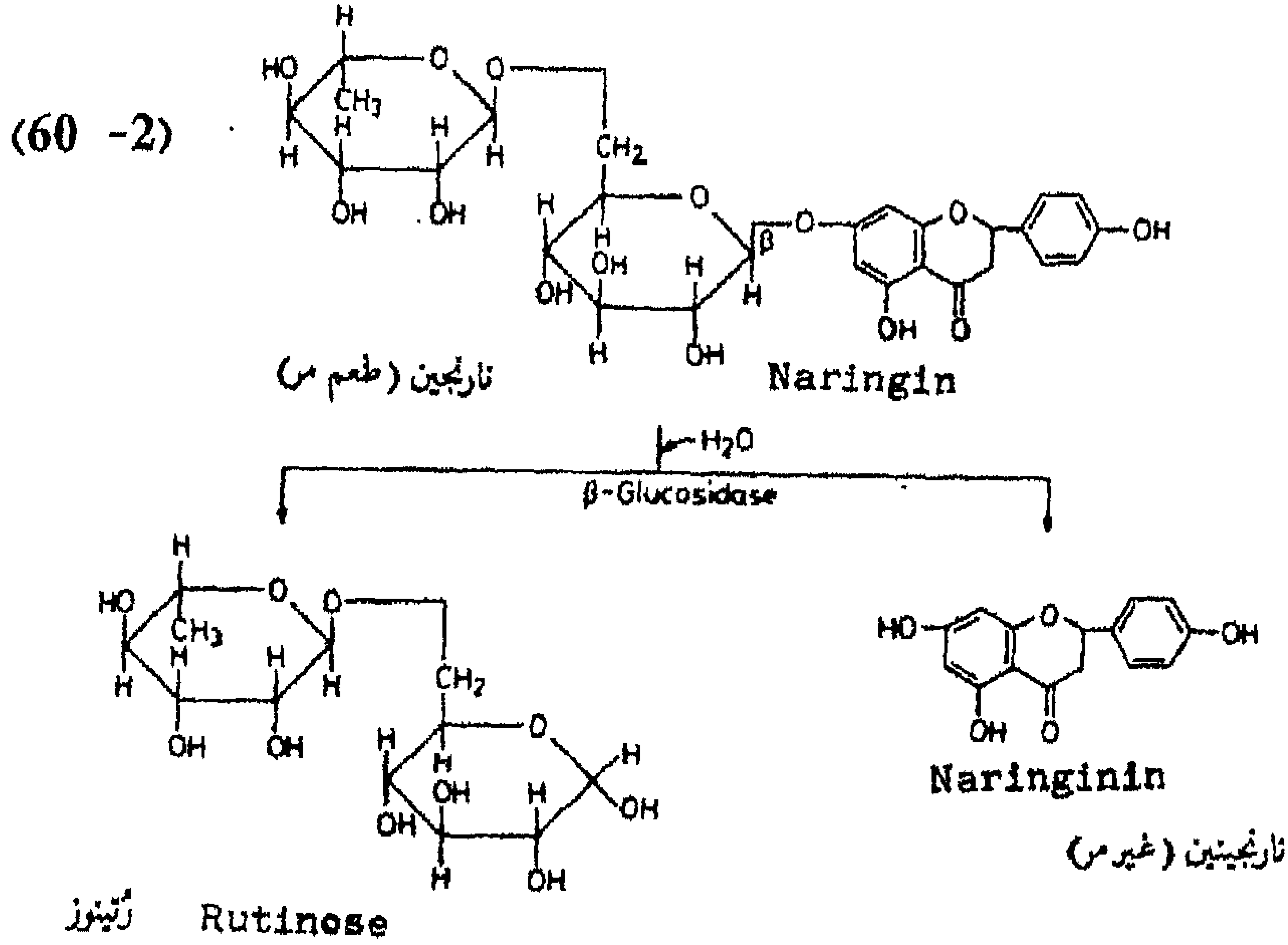
ومن الجدير بالذكر أن مصدر المرارة في اللوز هو المركب اميكدالين. ومن ناحية أخرى، يمكن إزالة الطعم المر في عصير الحمضيات بواسطة الأنزيمين Rhamanosidases و-β Glucosidase إذ أن مصدر المرارة مركب النارنجين Naringin وتزول المرارة عند تحلله المائي بأحد هذين الأنزيمين. ينتج

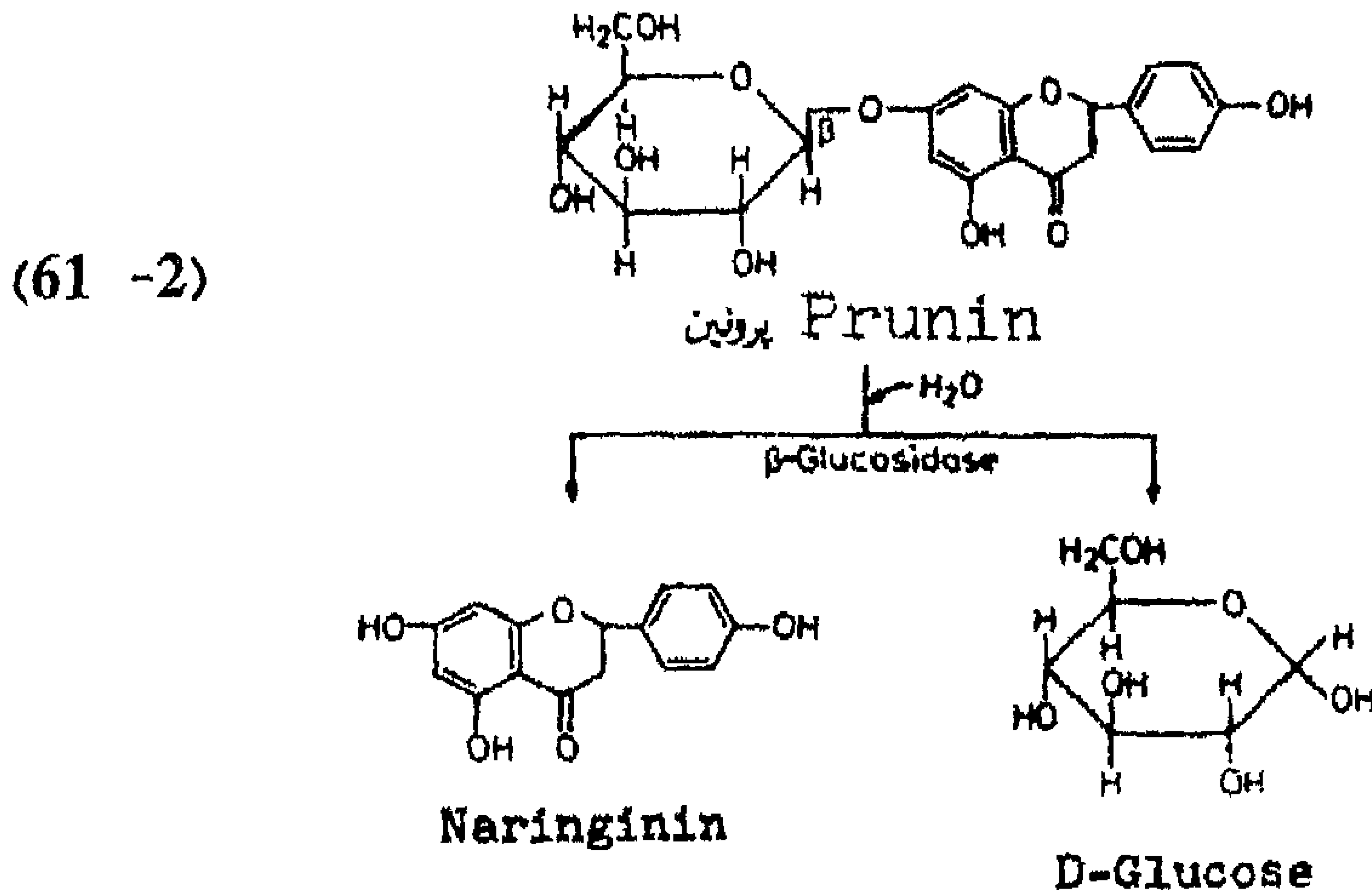
عن التحلل المائي للنارنجين بأنزيم Rhamnosidase مزيج من L- Rhamnose وPrunin والمركب الأخير غير مر.

أما التحلل المائي للنارنجين بأنزيم β- Glucosidase فينتج عنه 6-Rham- nosido -Glucose وNaringenin (غير مر) كما يحلل الأنزيم ذاته المركب Prunin إلى كلوكوز و Naringenin غير المر كما في المعادلات الآتية:



(59 -2)...

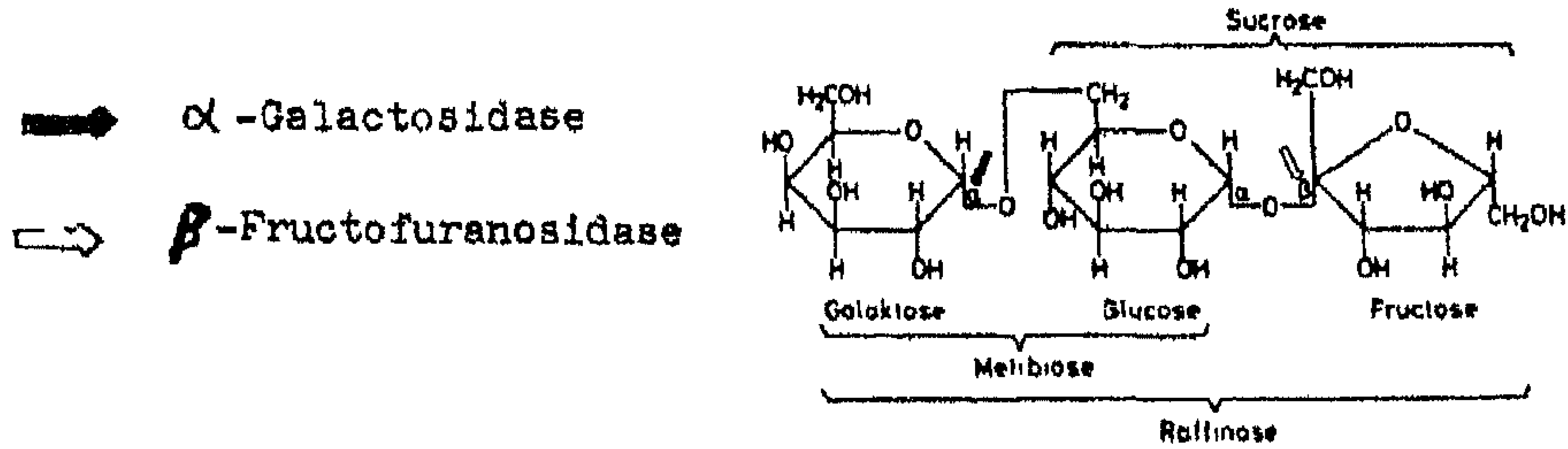




يــدعى الأنـزيمــان L-Rhamnosidase وGlucosidase -β ســوية بإســم Naringinase ويمكن الحصول على الـ Naringinase صناعيا من العفن.

α- D- Galactoside galactohydrolase, Ec 3.2.122 3-6-8-2

يعمل هذا الأنزيم بتخصص واسع نسبيا، فمثلا يحلل مائياً كلايكوسيد الميثانول وكلايكوسيد الفينول وكلايكوسيد المركب P-Nitrophenol وثنائيات السكريد مثل ميليبيوز وثلاثيات السكريد مثل الرافنوز Raffinose وقليلات السكريد وعديدات السكريد الحاوية على α- Galactoside ويوضح الشكل (2-39) موقع مهاجمة الأنزيم α- Galactosidase للمركب رافنوز.



شكل (2- 39) موقع مهاجمة الانزيم *α – Galactosidase* والانزيم *β – Fructofuranosidase* للمركب رافنوز.

يلعب تحلل وتخمر سكر الرافنوز دورا كبيراً في تكنولوجيا الإختمار للتمييز بين الخمائر التي تنمو في الأسفل Bottom fermenting yeast والتي تنمو في الأعلى Top fermenting yeast. تظهر جميع أجناس الخميرة S.cervisiae التي تمثل النوع الأول Bottom fermenting yeast ، نشاط الأنزيم α- Galactosidase إضافة إلى الأنزيم β-fructofuranosidase وبذلك تستطيع فلق سكر الفركتوز والكلوكوز من ثلاثي السكريد رافنو وكلا السكرين قابل للإختمار أما الكالتكوز الناتج فإنه غير قابل للإختمار هنا وبذلك يتخمر ثلثا سكر الرافنوز في الخمائر التي تنمو في الأسفل.

أما الخمائر التي تنمو في الأعلى فإنها تمتلك فقط الأنزيم β- Fructofuranosidase الذي يحلل الرافنوز مائيا إلى فركتوز وميليبيوز Melibiose (شكل 2-39) وبذلك تخمر ثلث السكر فقط.

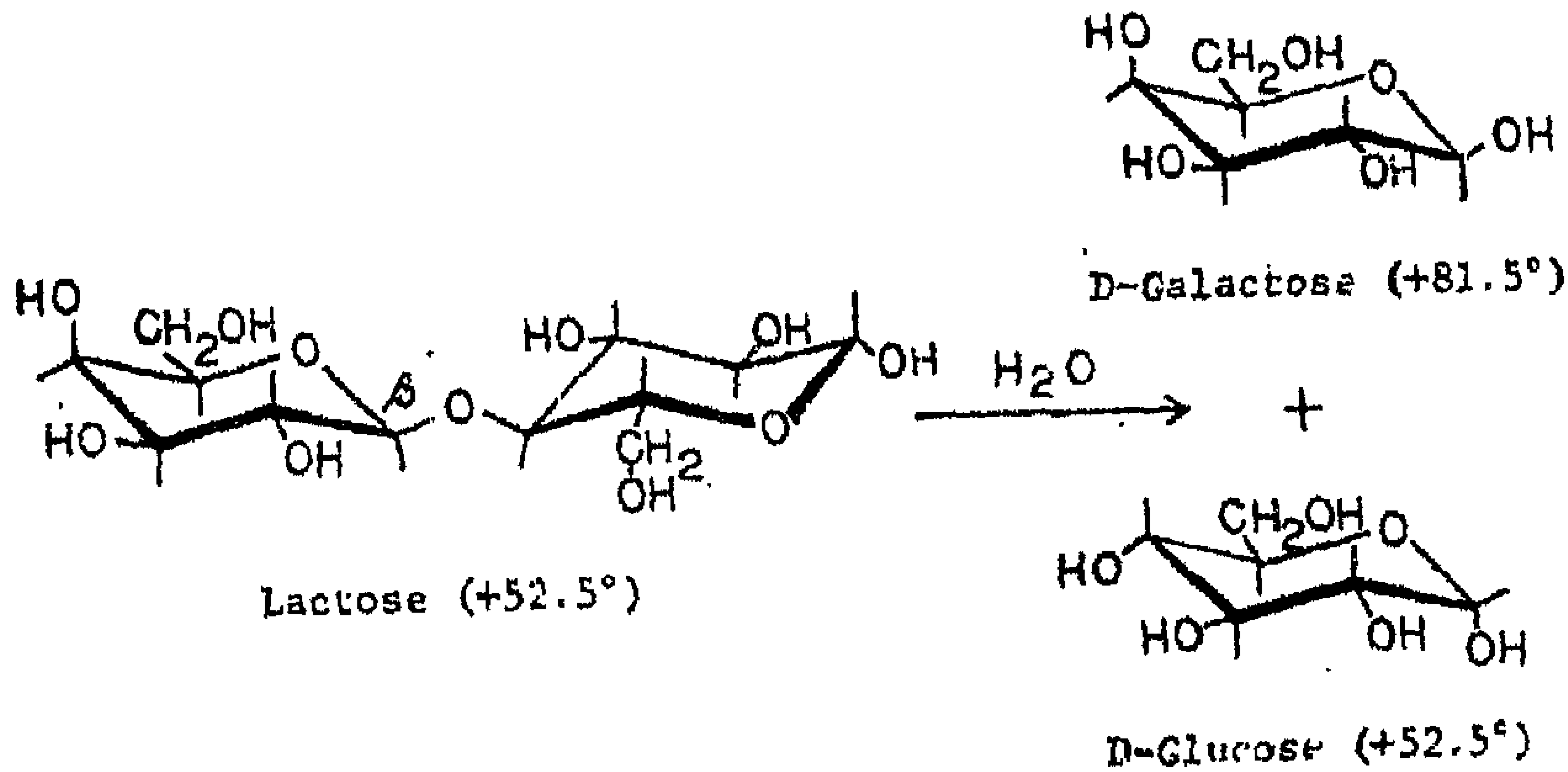
4-6-8-2) β-D- Galactoside galacto hydrolase, Ec 3.2.1.23

يمثل سكر اللاكتوز الركيزة الطبيعة للأنـزيم β-Galactosidase والـذي يسمى أيضاً Lactase إذ يحلل اللاكتوز إلى كلوكوز وكالكتوز. لهذا الأنـزيم أهمية كبيرة لكيمياي الأغذية لأن ناتجاً التحلل أكثر حلاوة من اللاكتوز. كما أن للالكتوز قابلية ذوبان محدودة

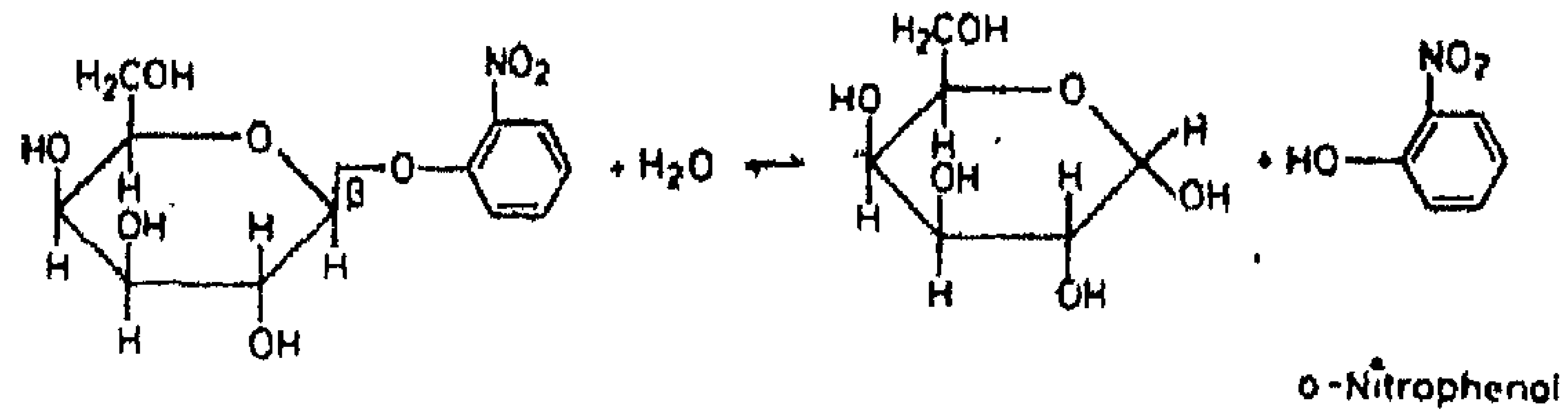
ولهذا يترسب من منتجات الألبان المجمدة ويكسبها قواماً رملياً إلا أن تحلله الجزئي إلى كلوكوز وكالكتوز يمنع حصول هذه الظاهرة غير المرغوبة.

وتجدرالإشارة هنا إلى أن للشعوب الأسيوية حساسية للحليب لفقدان الأنـزيم β- Golactosidase وبذلك لا يتمكن الشخص المصاب من أيض اللاكتوز.

هناك عدة طرق لتقدير النشاط الأنزيمي ومنها قياس التغير في الدوران النوعي Specific rotation من 52.5 إلى 67.0 نتيجة التحلل المائي للاكتوز:



يمثل المركب O- Nitro phenyl _ β_ galacto pyranoside ركيزة صنعية Artifcial للأنزيم وينتج عن فعله التحفيزي α- O-Nitrophenol و α-Galactose



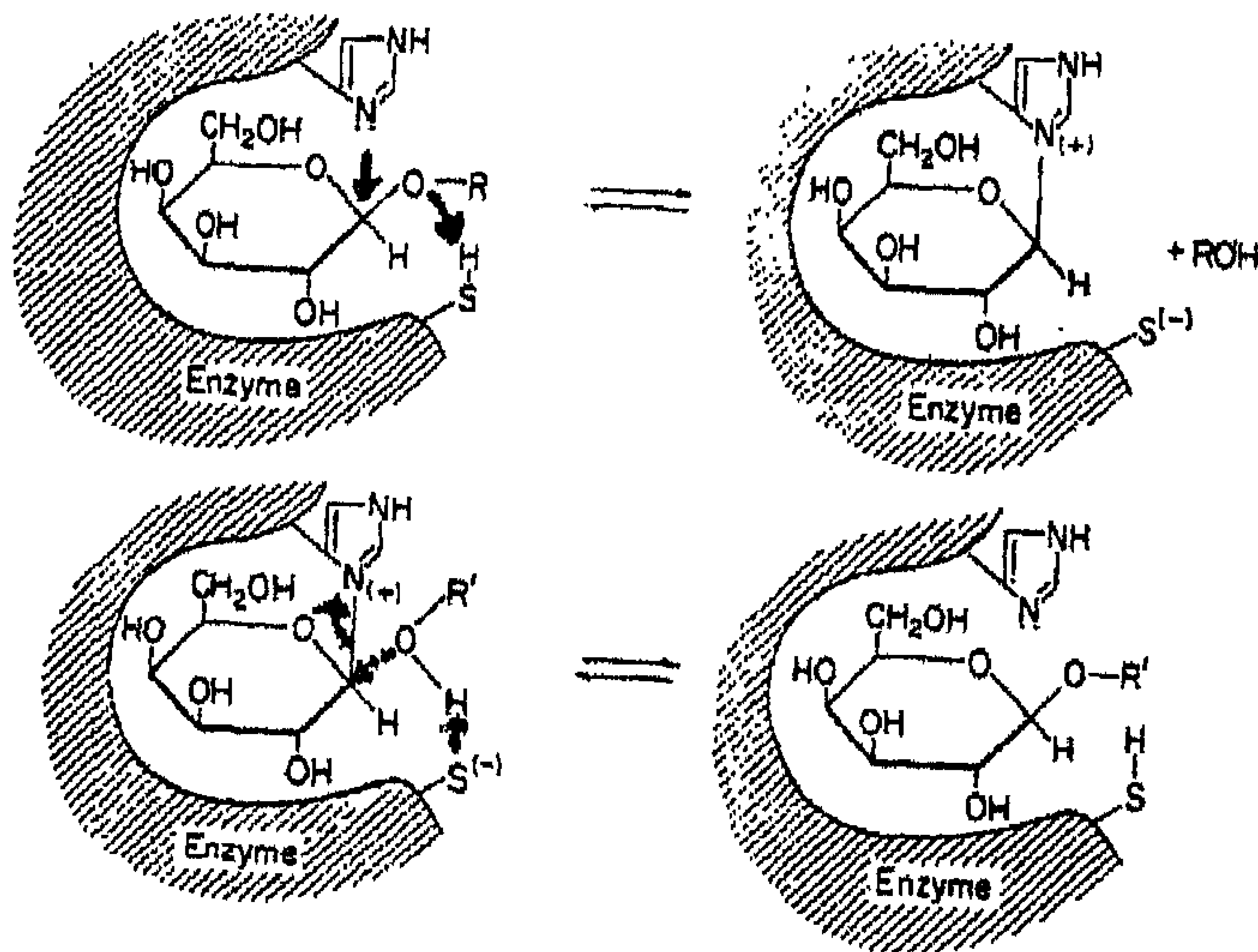
اورثو – نايتروفينول ، دي – كلاكتوز .

اورثو – نايتروفينيل – بيتا – دي – كلاكتوبايرانوسيد

وبعد جعل المحلول قاعدي، يمكن تقدير اللون الأصفر للأيون O- Nitrophenolate باستخدام المطياف.

آلية عمله :

تتضح الآلية المقترحة لعمل الأنزيم في الشكل (2-40). يحتوي الأنزيم في الموقع النشط على الحامض الأميني هستدين والحامض cysteine.

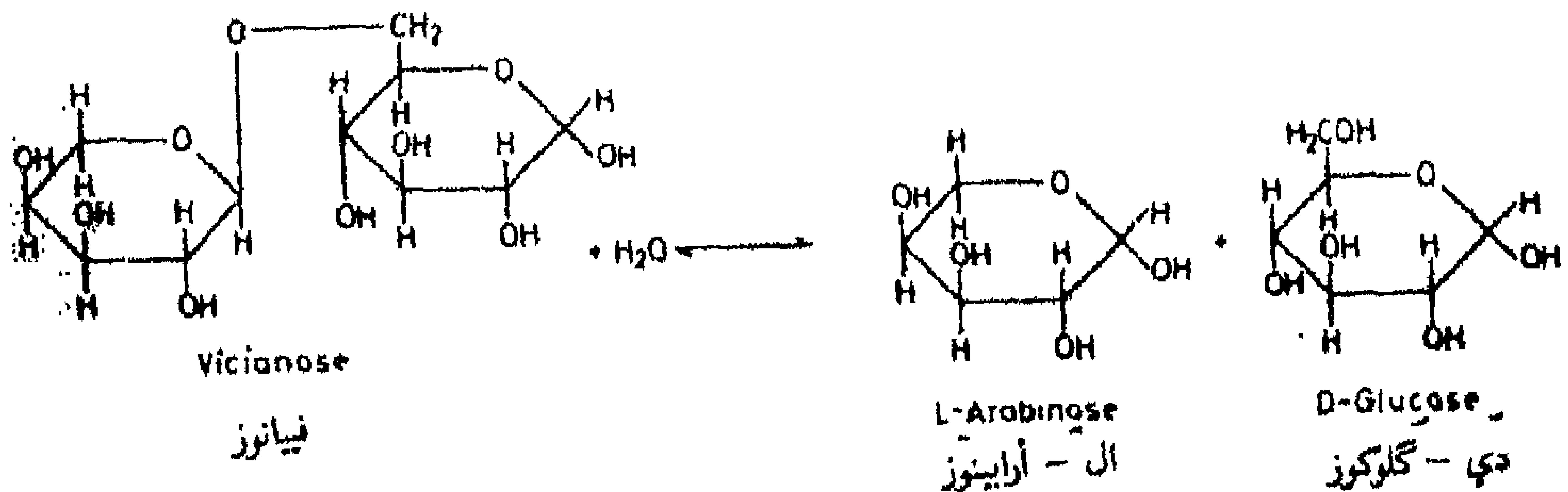


شكل (2- 20) الآلية المقترحة للانزيم *β – Fructofuranosidase* .

تعمل مجموعة الشايول (SH−) للستئين Cysteine بمثابة حامض إذ تهب بروتون إلى الأوكسجين الكلايكوسيدي فيما تعمل مجموعة الاميدازول كمجموعة محبة للنواة Nucleophilic لإنها تهاجم ذرة الكربون رقم (1) لجزء الكلايكون Glycone أي سكر الكالكتوز ويفترض تكون مركب وسطي يشتمل على آصرة تساهمية بين نتروجين حلقة الإميدازول وكربون رقم (1) لثمالة الكالكتوز.

ولتحرير الكالكتوز، يعمل الأيون السالب (S) بمثابة قاعدة فيأخذ بروتون من الماء تهاجم مجموعة الهدروكسيل المتكونة كربون رقم (1)، وعندئذ يتحرر الكالتوز، وكما يتضح من الشكل (2−40) لا يحصل أي تغيير في ترتيب المجاميع المرتبة بالكاربون الانومري Anomeric Carbon فالمركب الناتج يبقى بهيئة بيتا β- Galactose الوزن الجزيئي للأنزيم بسيتا كلوكوسيداز هو 700000 وتختلف عدد المواقع النشطة في الجزيئة تبعا لدرجة الحرارة، ففي المدى 4−6 درجات مئوية يوجد 1.9 مواقع نشطة ويزداد العدد إلى 4.7 في المدى 20−22°م.

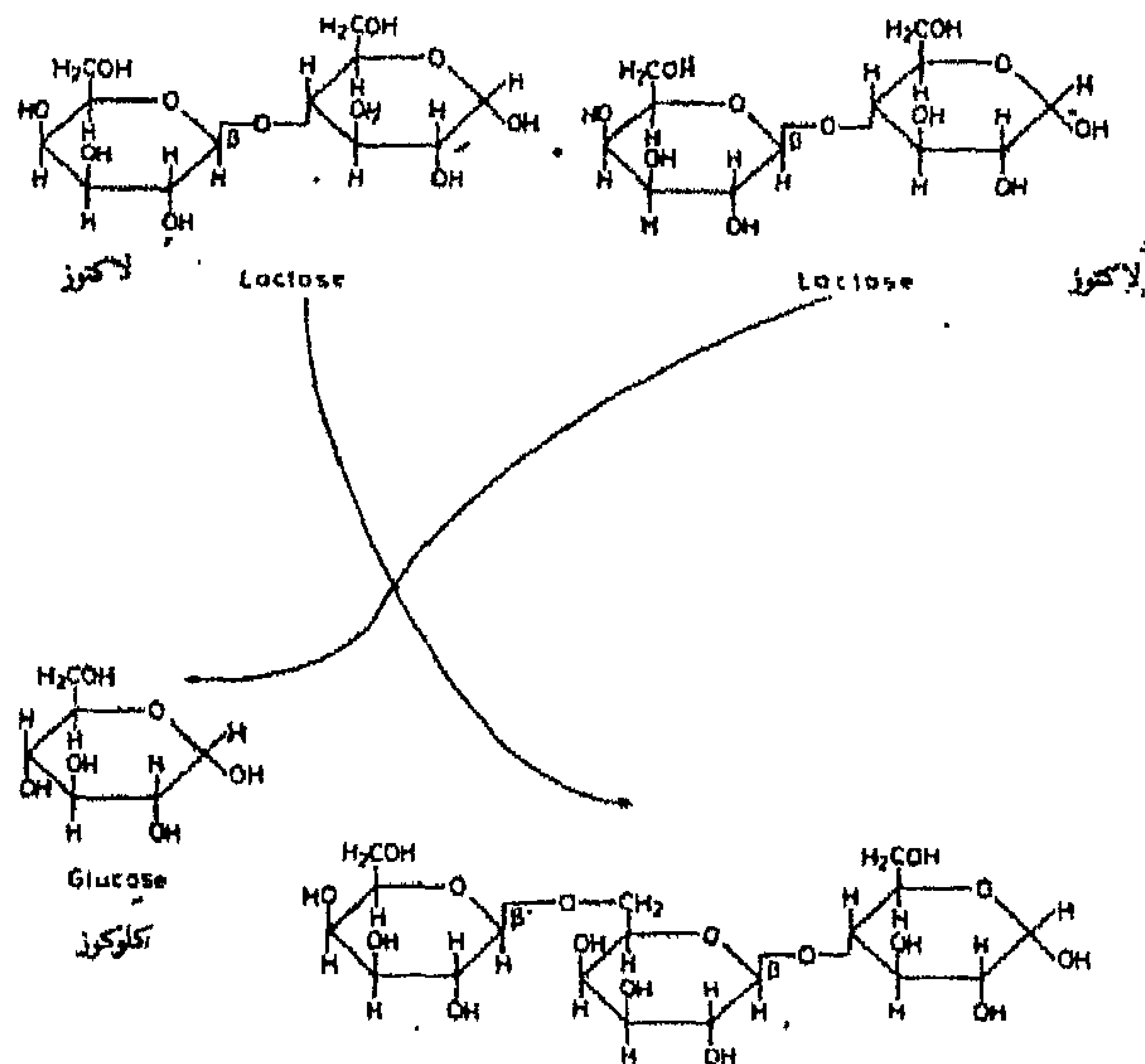
ويظهر بأن الجزيئة تتكون من عدة دون وحدات Sub units وربما خمسة منها. وفي السكريد يحتوي على ثمالة ارابنوز مرتبطة بثمالة كلوكوز بآصرة بيتا 1−6:



(65-2) ...

يتضح من هذا بأن تخصص الأنزيم يعتمد على حجم حلقة السكر pyranose أو Furanose والترتيب الفراغي لمجموعة الهدروكسيل الكلايكوسيدية (يجب أن تكون بيتا) إضافة إلى مجاميع الهدروكسيل الأخرى في الحلقة بينما لا يؤثر وجود كربون رقم 6 (في الكالتكوز) أو عدمه (في الإرابنوز) في تخصص هذا الأنزيم.

يستطيع أنزيم β- Galactosidase كذلك أن يعمل على نقل ثمالة السكر المرتبطة بآصرة كلايكوسيدية إلى جزيئات اخرى حاوية على مجاميع هدروكسيل فمثلا نقل ثمالة الكالكتوز من اللاكتوز إلى جزيئة لاكتوز أخرى وبذلك يتكون سكر ثلاثي جديد كما في المعادلة الآتية:



٦ – كلاكتوسيدو – لاكتوز

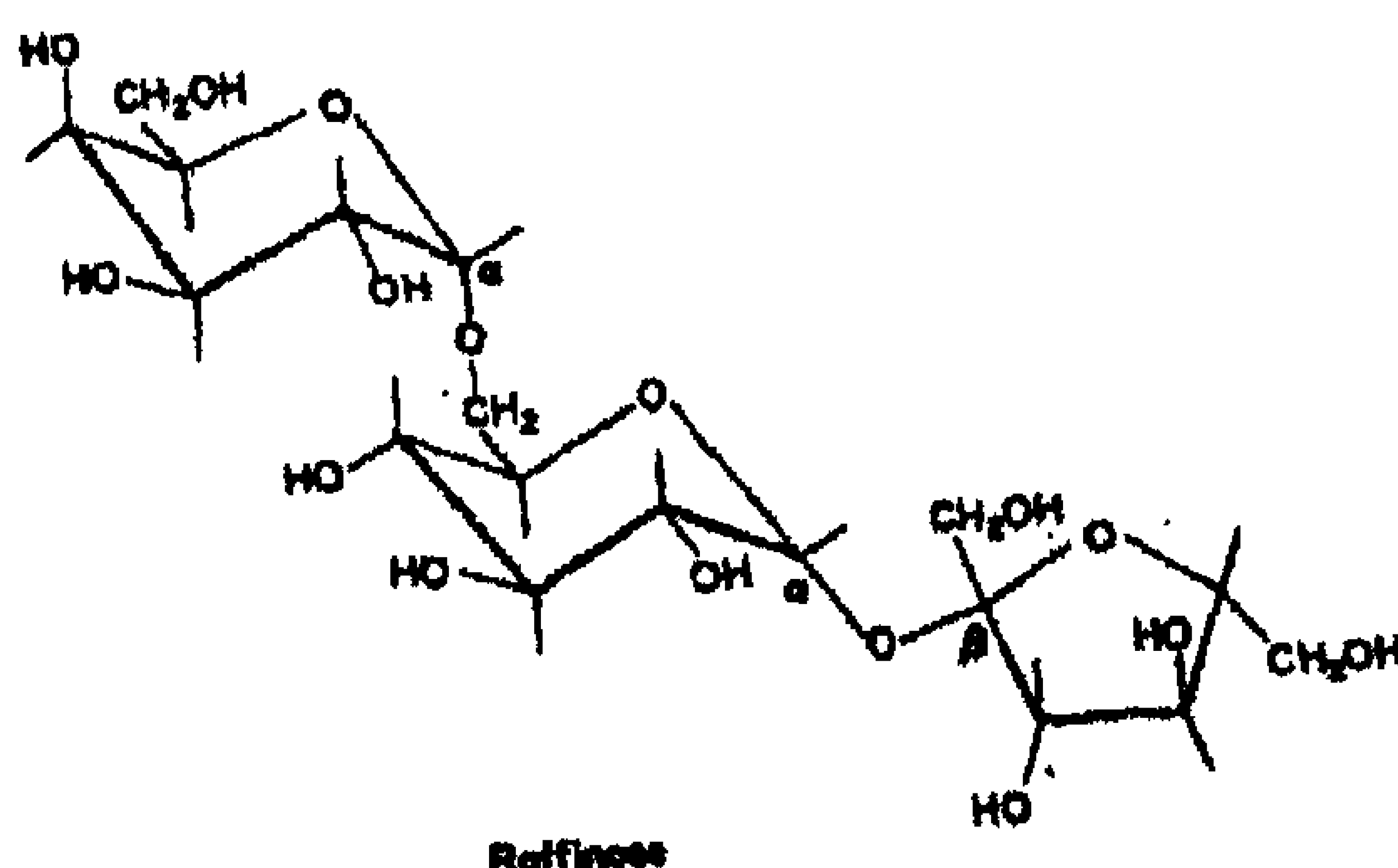
يمكن تنشيط الأنزيم β- Galactosidase بالمركبات المختزلة وكمثال cysteine وكبريتيت الصوديوم Sodium Sulfite وثنائي كبريتيد البوتاسيوم Potassium تعد هذه المنشطات مواد واقية تجاه المعادن الثقيلة (حديد ، نحاس) التي بتفاعلها مع مجاميع الثايول (SH_) في المركز الفعال للأنزيم تؤدي إلى

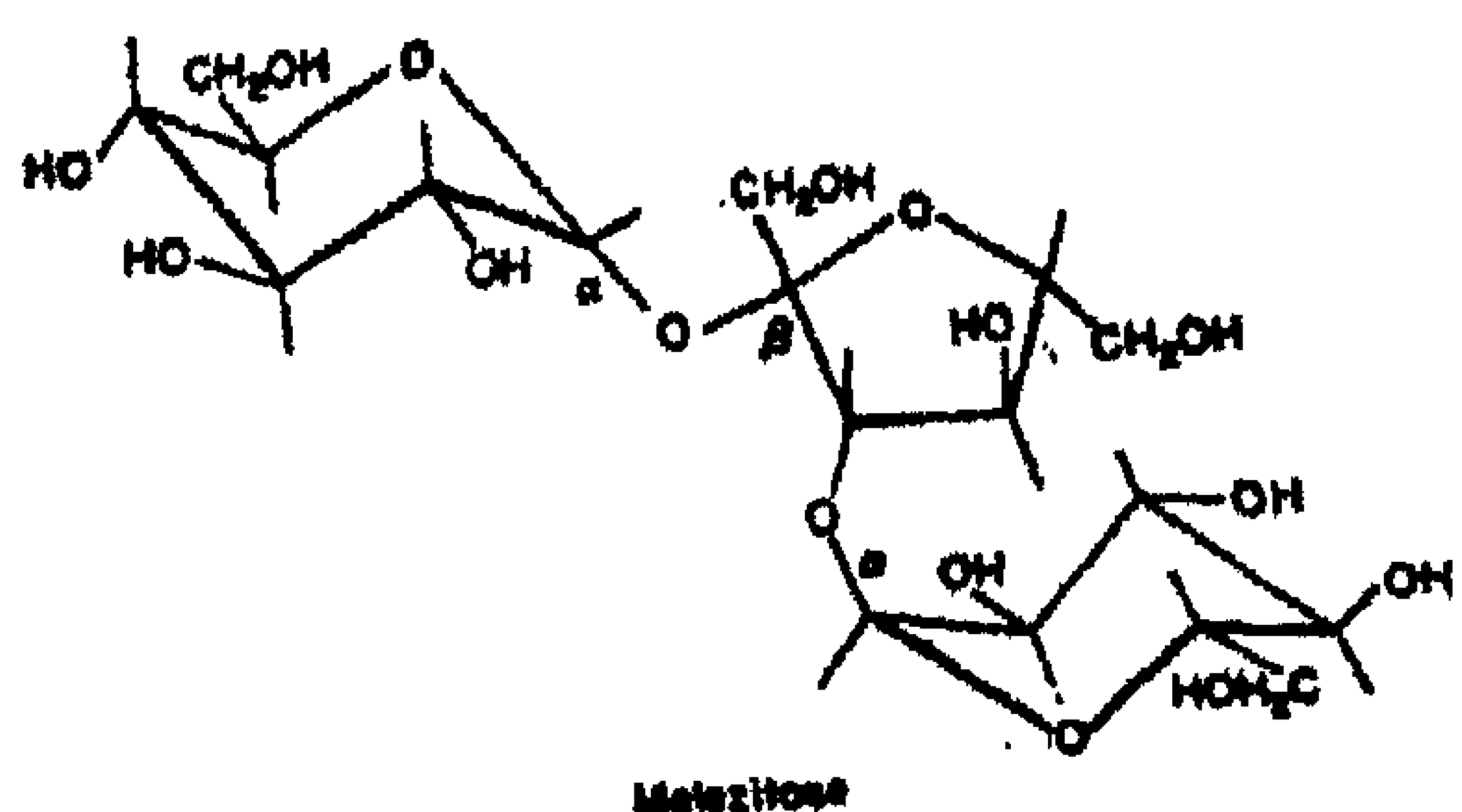
تثبيطه. إن الرقم الهدروجيني الأمثل للأنزيم يختلف تبعا لمصدره فهو 7.0 لأنزيم الاشر كولاي E.coli و 6.0 للخميرة Sacharomyces و 5.0 للعفن Aspergillus niger وكما ذكرنا سابقا فإن للأنزيم β- Galactosidase أهمية صناعية جديرة بالاهتمام إذ بواسطته يمكن تحويل اللاكتوز قليل الحلاوة وقليل الذوبان إلى مزيج من الكلوكوز والكالكتوز الأكثر حلاوة علما بأن التحلل المائي للاكتوز في المحلول الحامضي عسير جدا. وتعد الأحياء المجهرية Aspergillus niger و Saccharomyces و candida pseudotropicalis مصادر مهمة لتحضير هذا الأنزيم صناعيا.

β-D- Fructo Furanoside Fructohy drolase, Ec 3.2.1.26 5-6-8-2

β-Fructofuranosidase

يعد السكروز الركيزة الطبيعة للأنزيم β- Fructo furanosidase واسع الإنتشار في الطبيعة، إذ يوجد في الحيوانات والنباتات والأحياء المجهرية. هناك نوعان من الأنزيمات المحللة للسكروز وهما β- Fructo furanosidase وα-Glucosidase تتضمن الأصرة الكلايكوسيدية في السكروز، المجاميع المختزلة لكل من الكلوكوز والفركتوز. يحلل الأنزيم β- Fructofuranosidase الأصرة بين كربون رقم (2) لثمالة الفركتوز وأوكسجين الأصرة الكلايوكسيدية بينما يحلل الأنزيم α-Glucosidase الأصرة بين كربون رقم (1) لثمالة الكلوكوز وأوكسجين الأصرة الكلايكوسيدية ويمكن التمييز بين هذين الأنزيمين باستعمال $H_2{}^{18}O$ إلا أن هذه الطريقة غير ملائمة للتطبيق العملي ذلك لأنه يجب فصل ناتجي التفاعل وتحليلهما باستخدام المرسام الطيفي الكتلي Mass spectrometry. إن أفضل طريقة للتمييزبين هذين الأنزيمين هو استعمال ثلاثيات السكريد Raffinose و Melezitose الموضحة تراكيبها في أدناه (شكل 2-41).

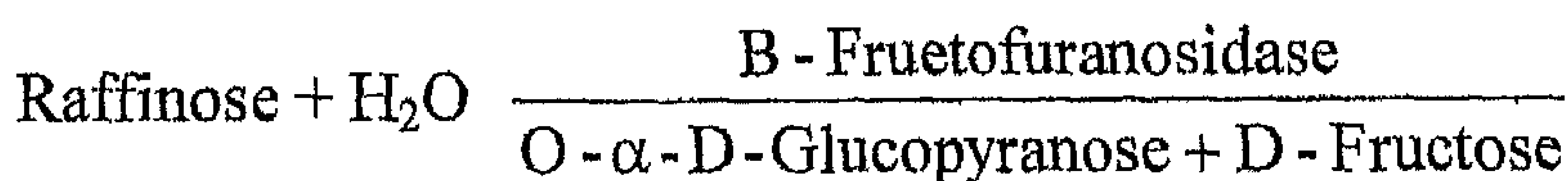




شكل (2- 41) تركيب ثلاثي السكريد رافنوز وميليزيتوز.

ويمكن تمثيل التفاعلات بالمعادلات الآتية:

(66-2) Raffinose + H_2O $\underline{\alpha\text{-Glucosidase}}$ لا يحصل تفاعل



$$\text{Raffinose} + H_2O \frac{\text{B - Fruetofuranosidase}}{\text{O - }\alpha\text{ - D - Glucopyranose + D - Fructose}}$$

O-α- D. Galactopyranasyl (1 → 6) -

(67-2)



Melezitose + H_2O $\underline{\alpha\text{- Glucosidase}}$ D- Glucose + Turanose

(68-2)

ايزومر للسكروز

(69-2) Melezitose + H_2O $\underline{\text{B. Fructofuranosidases)}}$ لا يحصل تفاعل

يتضح من المعادلات (2-66 إلى 2-69) والشكل (2-41) بأن كلا من الأنزيمين α-Glucosidase و β- Fructo furanosidase ذو تخصص لثمالة سكر (كلوكوز أو فركتوز على التوالي) مرتبطة بآصرة كلايكوسيدية من خلال ذرة الكربون الأنوميرية وأن أي تحوير في ثمالة السكر وكمثال في الكربون رقم 6 لثمالة الكلوكوز لسكر الرافنوز وفي الكربون رقم 3 لثمالة الفركتوز في الميليزيتوز Melezitose يمنع الفعالية التحفيزية للأنزيم $-\alpha$.

α- Glucosldase تجاه الرافنوز وللأنزيم β- Fructofuranosidase تجاه الميليزيتوز، وبهذه الطريقة يمكن التمييز بين الأنزيمين بسهولة.

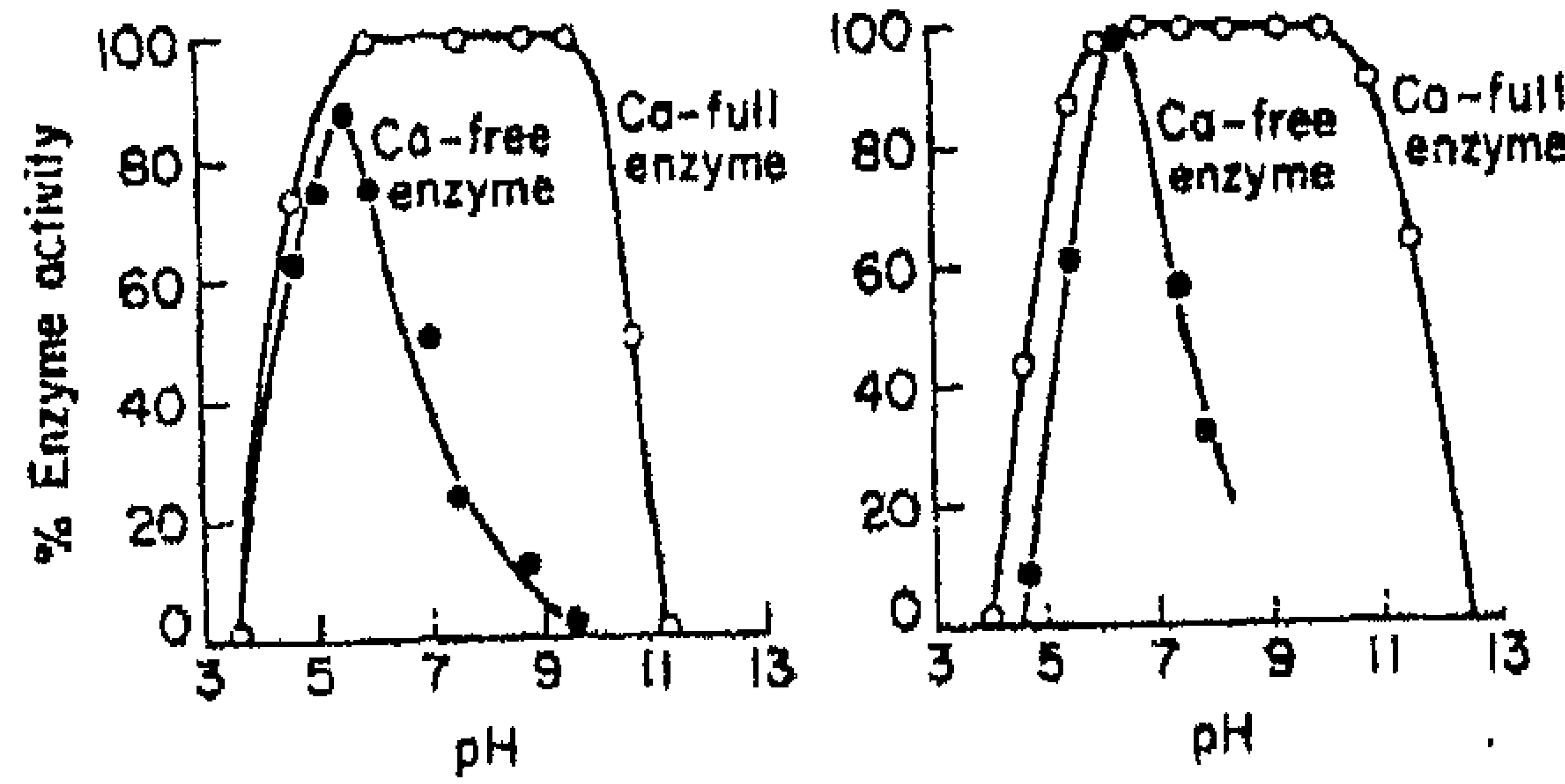
إن الرقم الهدروجيني الأمثل للأنزيم β- Fructofuranosidase المستخلص من الخميرة S.cerevisiae هو 4.5 بينما يظهر منحني الفعالية ضد الرقم الهيدروجيني (شكل 2-38) مدى واسعا للرقم الهيدروجيني الأمثل (3.5-5.5) للأنزيم α-Glucosidase.

2-8-6-6 (.4- α-D- Glucan glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.1.1)

α - Amylase

ينتشر الأنزيم في المملكة النباتية والحيوانية ويوجد في الحيوانات الراقية في اللعاب والبنكرياس ويعلب درواً كبيراً في تحلل النشا في الغذاء حيث يحلل مائيا الأواصر الفا 1—4 الكلايكوسيدية بصورة عشوائية وينتج عن عمله مزيج من قليلات السكريد يمكن تحللها مائيا بأنزيمات أخرى محللة لثنائيات السكريد Disaccharides وثلاثيات السكريد Trisaccharides وبذلك تتحول إلى أحاديات السكريد التي تمتص من قبل الأمعاء الدقيقة. يعد الكالسيوم تميم العامل Cafactor لهذا الأنزيم إذ أنه ضروري لفعاليته وعند وجود أيونات الكالسيوم هذه، تزداد مقاومة الأنزيم للحرارة ولتغير الرقم الهيدروجيني ذلك

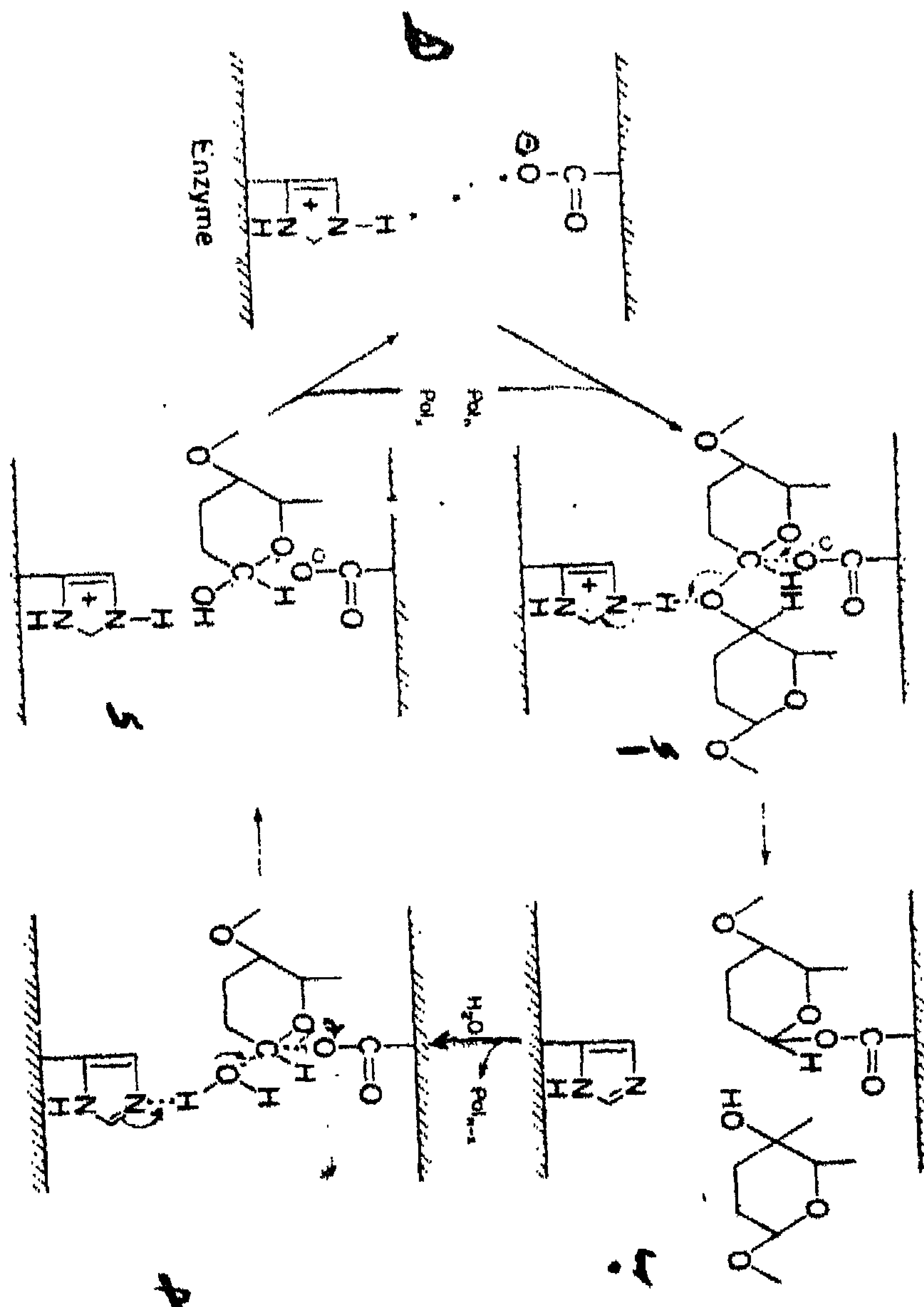
لأن أيونات الكالسيوم تحافظ على التركيب الثانوي والثالثي لجزيئة الأنزيم. وقد تم إثبات ذلك عمليا إذ يوضح الشكل (2-42) بأن إزالة Ca_2+ كلياً من الأنزيم تؤدي إلى فقدان نشاطه وجعله أقل استقراراً في الرقم الهيدروجيني القاعدي (شكل 2-42).



شكل (2- 42) تأثير أيونات الكالسيوم في ثبات الانزيم *α – Amylase* ثم حضن الانزيم لمدة 20 ساعة في درجة 25^oم وفي ارقام هيدروجينية مختلفة وقيست الفعالية المتبقية في كل رقم هيدروجيني للانزيم بوجود (5- 5) وعدم وجود الكالسيوم (5- 5). الشكل إلى اليسار لانزيم *α – Amylase* لبنكرياس الخنزير، والشكل إلى اليمين لانزيم *α – Amylase* للبكتيريا *β – Subtilis*

الآلية المقترحة لعمل الأنزيم

يوضح الشكل (2-43) الآلية المقترحة لعمل أنزيم. يحتوي الموقع النشط للأنزيم على مجموعة كربوكسيل ومجموعة حاوية على نتروجين لا يعرف على وجه التحديد طبيعتها إذ تمتلك قيمة Pka تتراوح بين 6.5 و8.0 وقد تكون اميدازول Imiadazol أو مجموعة امينو. إن الأدلة العملية لتأثير الأكسدة الضوئية أو أيون الكلوريد في نشاط الأنزيم الفا- اميلاز لبنكرياس الخنزير وكذلك حرارة التأين kcal/ mol4 توحي بأن المجموعة هي اميدازول.

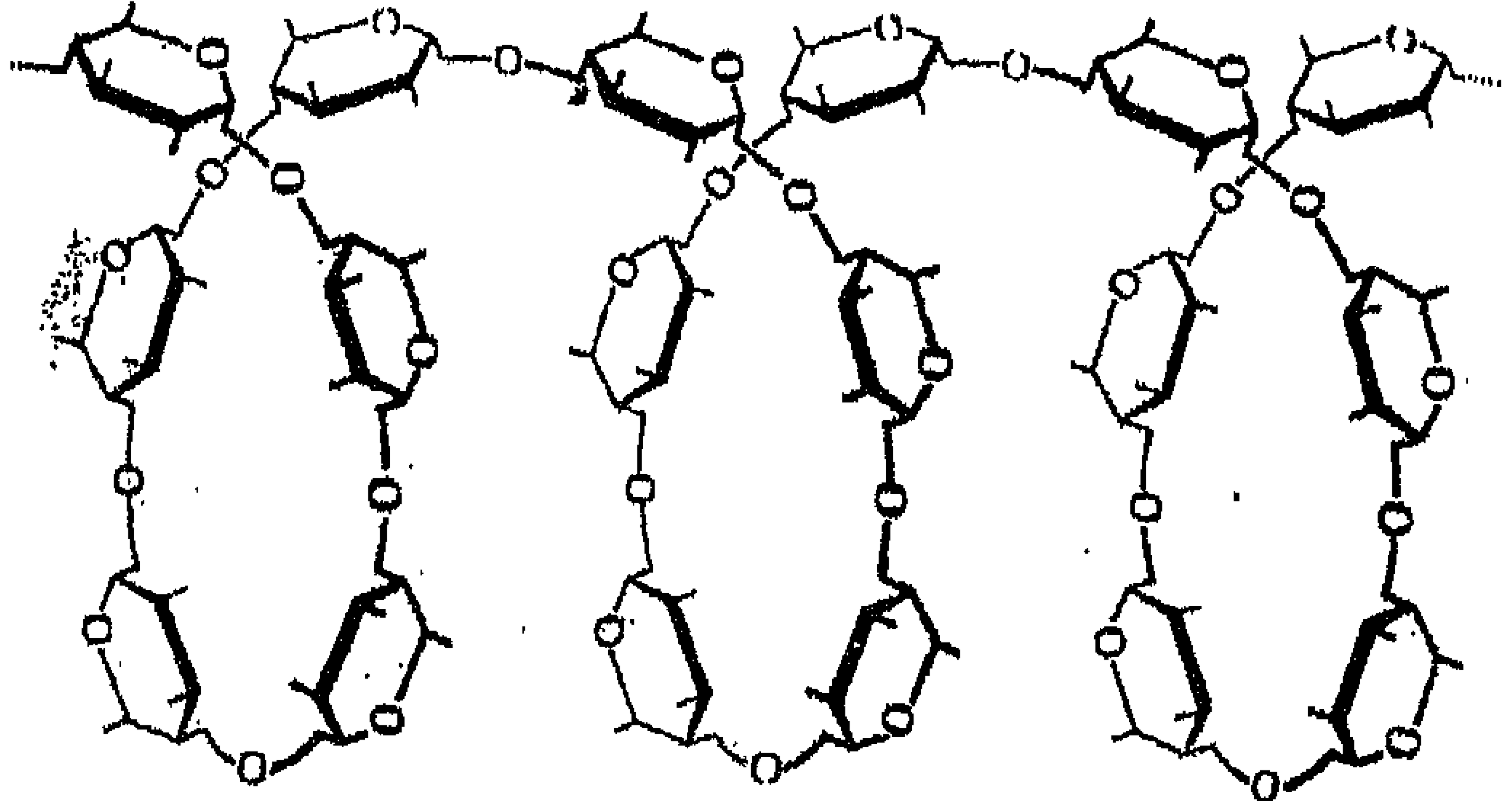


شكل (2- 43) الآلية المقترحة لعمل الانزيم *α – Amylase*

عند حضن الأنـزيم والركيـزة، يتكـون معقـد امتـزازي Adsorptive complex وينظم بشكل بحيث تكـون الآصـرة الكلايكوسيدية للركيـزة

مجاورة لمجموعة الاميدازول ومجموعة الكربوكسيل (شكل 2-43أ). تهاجم مجموعة الكربوكسيل سالبة الشحنة والمحبة للنواة، كربون رقم (1) للركيزة وهذا الهجوم يساعد في برتنة Protonation أوكسجين الاصرة الكلايكوسيدية. ويكون مصدر البروتون، أيون الاميدازول وهذا مثال للتحفيز الحامضي العام. يتكون نتيجة لذلك مركب وسطي ليشتمل على الأنزيم المرتبط بالركيزة Glycosyl -enzyme intermediate (شلك 2-43ب) ويمثل ما تبقى من جزيئة البولمير بعد إزالة ثمالة كلوكوسيل منها. تحفز مجموعة الاميدازول غير المبرتنة Nonprotonated تفاعل إزالة الكلوكوكسيل وهي بذلك مثال للتحفيز القاعدي العام إذ تزيل بروتون من الماء (شكل 2-43ج) مخلفة _OH لمهاجمة كربون رقم 1 للمعقد Glycosyl -enzyme وبذلك تصبح مجموعة الاميدازول مبرتنة وينفصل البولمير المتبقي Polx(شكل 2-43د) وبذلك يعود الأنزيم لهيأته الأصلية (شكل 2-43هـ) ليعمل على جزيئة بوليمر من جديد.

لأنزيم الفا- اميلاز دور كبير جدا في تحضير الخبز إذ يهاجم الأنزيم مواقع عديدة في الإميلوز والاميلوبكتين مما يؤدي إلى انخفاض لزوجة غراء النشا لهذا يدعى الأنزيم α-amylasez بأميلاز الاسالة لتقليله لزوجة النشاء وجعل المحلول أكثر سيولة. إن مهاجمة الأواصر الداخلية الفا 1—_4 لعديد السكريد بصورة عشوائية يؤدي إلى تكوين قليلات السكريد الحاوية على 5 إلى 7 وحدات كلوكوز وهذا العدد يطابق وحدات الكلوكوز الموجودة في لفة واحدة من لولب جزيئة الإميلوز (شكل 2-44).



شكل (2- 44) جزيئة الأميلوز ومواقع الهجوم الأولي $\alpha - Amylase$ للأواصر $\alpha - 1.4$ من السلسلة يستطيع الانزيم مهاجمة الأميلوز زالاميلوبكتين ويتكون نتيجة لفعالية قليلات متكونة من 5- 7 وحدات كلوكوز.

لا تتكسر الأواصر الفا 1-6 لجزيئة الإميلوبكتين بواسطة الالفا- اميلازو ولهذا يتكون أخيرا نتيجة لفعل هذا الأنزيم في الإميلوبكتين، ايزومالتوز Isomltose ويمكن توضيح الفعالية الأنزيمية في الإميلوز والإميلوبكتين بالشكل (2-45).



شكل (2- 45) فعل انزيم $\alpha - Amylase$ في الأمليوزوالاميليوبكتين تمثل الأسهم الثخينة مواقع الهجوم الأولية للانزيم والأسهم الخفيفة مواقع الهجوم الثانوية.

ومن الناحية النظرية يمكن الحصول على 87٪ مالتوز و13٪ كلوكوز نتيجة لفعل الفا- اميلاز في الإميلوز، و73٪ مالتوز و8٪ ايزومالتوز و19٪ كلوكوز لفعل نفس الأنزيم في الإميلوبكتين. إلا أنه يتعذر الحصول على هذه النسب عمليا في نظام مغلق لأن المالتوز المتكون يثبط الأنزيم تنافسياً. وفي الصناعة يجري العمل عادة في نظام مفتوح Open System حيث يتحول المالتوز الناتج بواسطة أنزيمات الخمائر إلى كلوكوز لا يلبث أن يتخمر إلى CO_2 إيثانول.

2-8-6-17 β- Amylase (1,4 α-D-Glucan malothdrolase, E.C. 3.2.1.2.)

يحلل هذا الأنزيم الأواصر الفا 1 ← 4 الكلايكوسيدية للنشأ والكلايكوجين بحيث يزل وحدات المالتوز من النهاية غير المختزلة للسلسلة مع تحويل شاكلة الكلايكون Glycone على ذرة الكربون رقم (1) من الصيغة الفا إلى الصيغة بيتا.

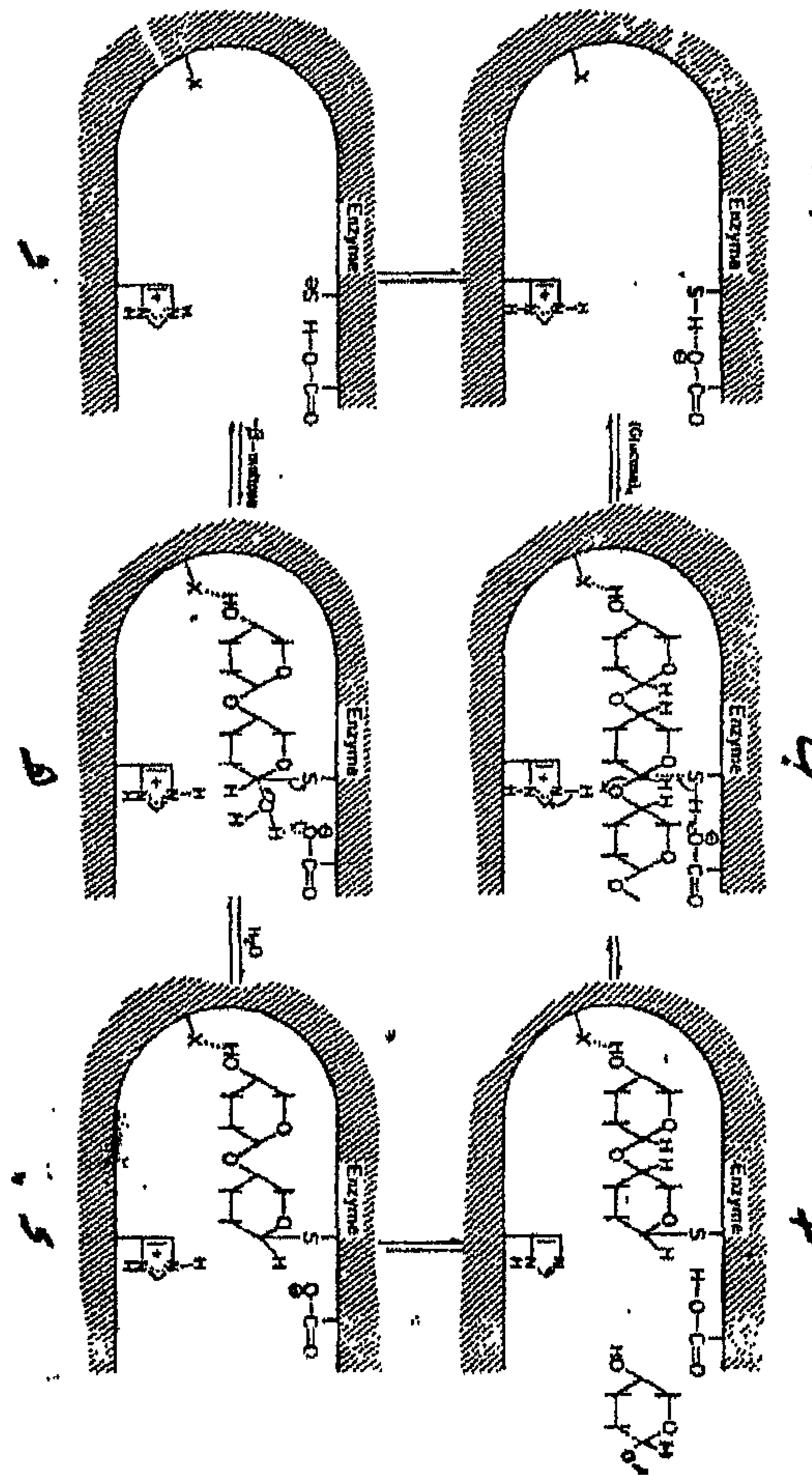
يوجد الأنزيم بيتا- اميلاز في النباتات العليا بصورة رئيسية وقد أمكن دراسته بالتفصيل بعد بلورته من المصادر المختلفة مثل الحنطة والشعير وفول الصويا والبطاطا الحلوة Sweet potato.

لأنزيم بيتا- اميلاز أهمية تذكر عند الطهو البطيء للبطاطا الحلوة حيث يحول كميات كبيرة من النشأ إلى سكر المالتوز.

الوزن الجزيئي للأنزيم المستخرج من البطاطا الحلوة 152000 وبصورة عامة يكون الوزن الجزيئي للأنزيم بيتا- اميلاز أعلى منه للأنزيم الفا- اميلاز. الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم بيتا- اميلاز يقع في المدى 5-6. تثبط كواشف مجموعة السلفهايديل -SH نشاط الأنزيم مما يشير إلى أهمية هذه المجموعة في النشاط الأنزيمي.

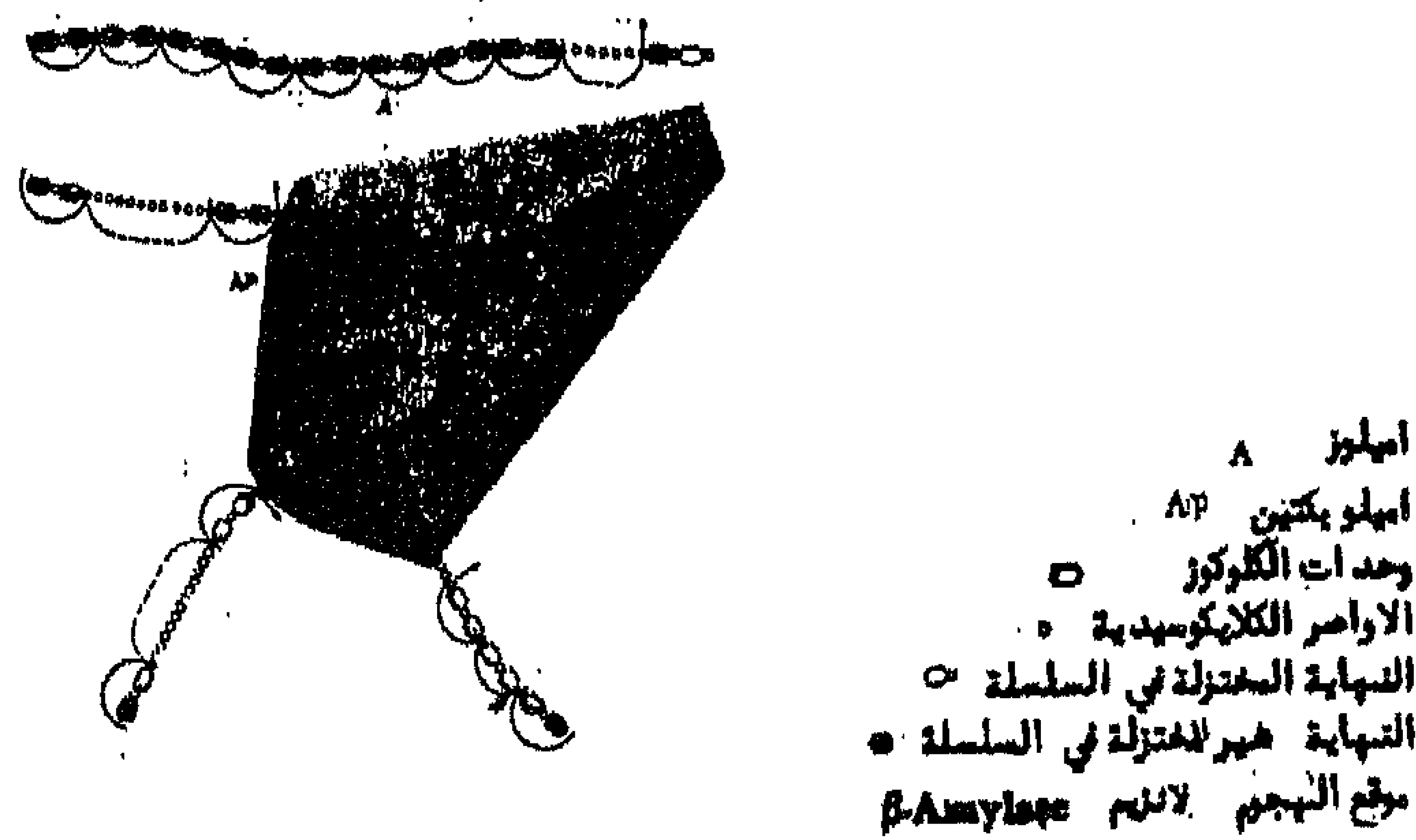
الآلية المقترحة لفعالية الأنزيم التحفيزية

يوضح الشكل (2-46-أ) المجاميع الأربعة الفعالة في الموقع النشط للأنزيم وهي مجموعة SH- ومجموعة الكربوكسيل COO- ومجموعة الاميدازول والمجموعة x القابلة للتآصر الهدروجيني مع مجموعة الهدروكسيل على الكربون رقم 4 لثمالة Residue السكر في النهاية غير المختزلة للجزيئة عند تكوين المعقد بين الأنزيم والركيزة (2-46-ب)، تهاجم المجموعة SH- نواة الكربون رقم (1) وتسهل هذه العملية بفعل مجموعة الكربوكسيل التي تعمل بمثابة قاعدة بينما تقوم مجموعة الاميدازول بمثابة الحامض وتهب الهدروجين لأوكسجين الآصرة الكلايكوسيدية كما في الشكل (2-46-ب) مما يؤدي إلى تكوين المركب الوسطي Maltosyl-enzyme intermediate(شكل 2-46) حيث يرتبط المالتوز بآصرة تساهمية بالأنزيم عن طريق -S- وفي المرحلة الأخيرة لهذه الآلية، تسهل مجموعة الكربوكسيل (التي تعمل بوصفها قاعدة) مهاجمة الماء للكربون رقم (1) لتحرير بيتا- مالتوز (انظر الشكل: هـ نفسه) وعند ذلك يرجع الأنزيم لحالته الأصلية.



شكل (2- 46)الآلية المقترحة لانزيم $\beta - Amylase$

يوضح المخطط (2-47) فعالية الأنزيم بيتا- اميلاز في الإميلوز والإميلوبكتين. تدل الأدلة العملية على أن الأنزيم الإميلاز يحمل على سطحه ثمالات Residuesلأحماض امينية غير قطبية ولقد تم إثبات ذلك من قبل الباحث دلاور صابر D.Sabir عام 1984 حيث تمكن من عزل الأنزيم من مادة (منّ السما) Manna بواسطة كروماتوكرافي التآثر الهدروفوبي Hydrophobic interaction Chromatography كما تمكن الباحثان بركنر Bergner وصابر من عزل اميلاز عسل النحل وفصله بواسطة Phenyl-butylamine Sepharose 4B



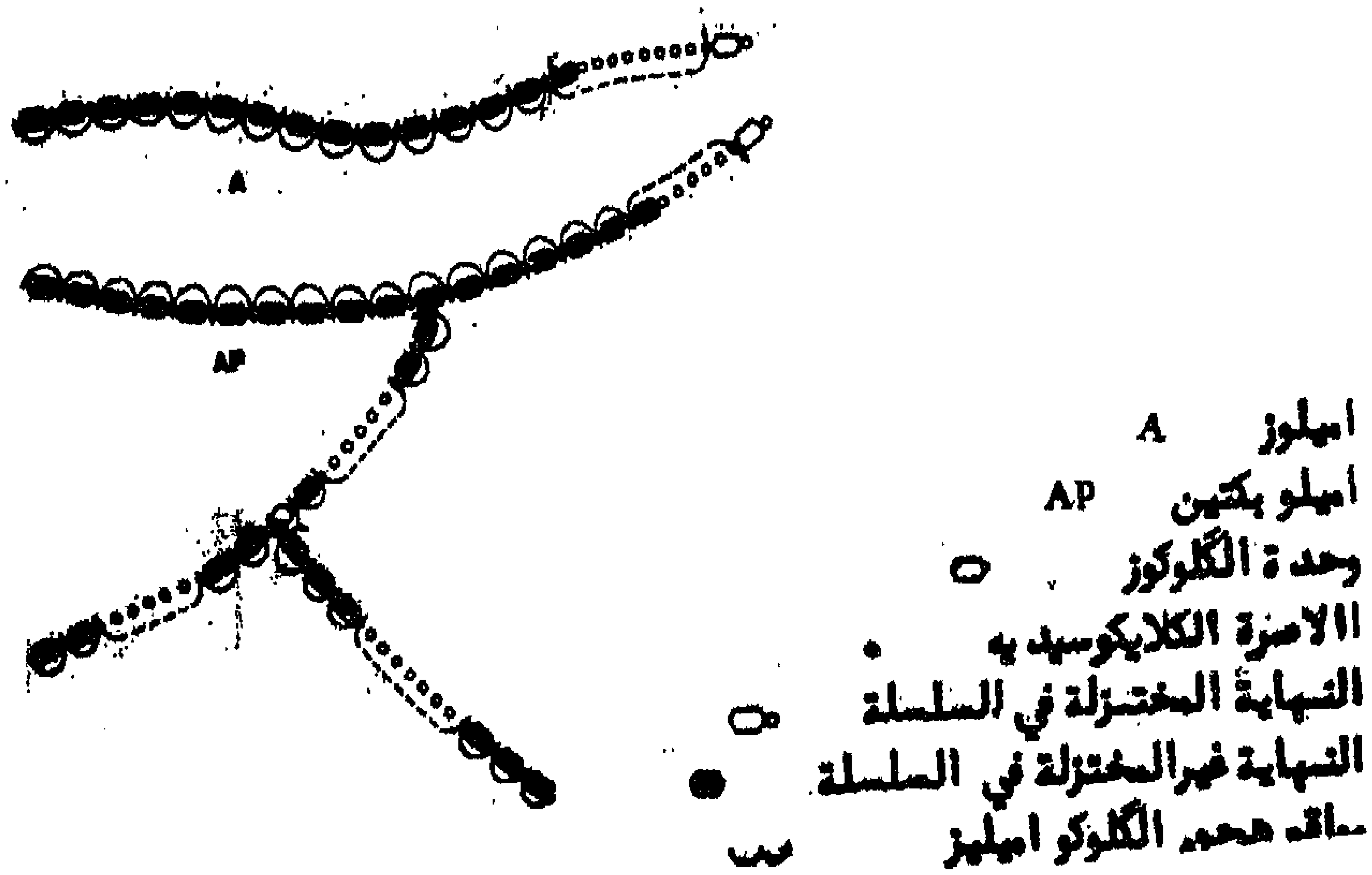
شكل (2- 47) مخطط يوضح فعالية الانزيم بيتا- أميلاز في الأميلوز والاميلوبكتين.

مما يدل على وجود ثمالات الأحماض الأمينية غير القطبية على سطح الأنزيم وكمثال ثالين، لوسين، ايزولوسين، فنيل الانين، تيروسين وتربتوفان. ولقد كان يعتقد منذ مدة طويلة بأن هذه الثمالات ترتب نفسها داخل الشكل الكروي Globular لجزيئة البروتين فقط وأن هذا الترتيب مفيد لاستقرارية الجزيئة إلا أن Klotz تمكن عام 1970- باستخدام الأشعة السينية- من البرهنة من أن أكثر البروتينات تملك جزءا قليلا جدا من الأحماض الأمينية الهدروفوبية على سطحها وأن هذه الأحماض تتآثر مع المحيط ولقد اثبت باحثون آخرون فيما بعد فكرة Klotz وكمثال Hjerten عام 1973 و Hofstee عام 1973 و Porath عام 1973 وكذلك Shaltiel عام 1973 وأوضحوا إمكانية حصول تآثرات هدروفوبية بين المجاميع الهدروفوبية الجانبية للبروتين من جهة وبين مطرقة الهلام Gel matrix– المستخدم في فصل هذه البروتينات من جهة أخرى – وبوجود الماء.

(1.4 α-D-Glucan glucohydrolase, Ec. 3.2.1.3) Glycoamylase1 8-6-8-2

يشطر هذا الأنزيم الأواصر الكلايكوسيدية الخارجية ألفا 1——4 لسلسلة عديد السكريد مزيلاً بذلك وحدات الكلوكوز المتتالية من النهاية غير المختزلة لسلسلة الركيزة.

وهذا يكون الكلوكوز فقط ناتج الفعالية التحفيزية للأنزيم وهذا يميز الأنزيم Glucoamylase من ألفا وبيتا- اميلاز كما يحفز الأنزيم أعلاه التحلل للأواصر ألفا 1——6 أيضاً (شكل 2-48).



شكل (٢ – ٤٨) فعالية الانزيم Glucoamylase في الاميلوز والاميلوبكتين.

يعد العفن Asp. Niger. Asp. Oryzae أهم مصدر للأنزيم الذي يعمل في المدى 4- 5 للرقم الهيدروجيني وفي الدرجة الحرارية 50-60°م. ويعد الأنزيم الوحيد المحلل للنشا. في فترة قصيرة نسبياً – إلى كلوكوز.

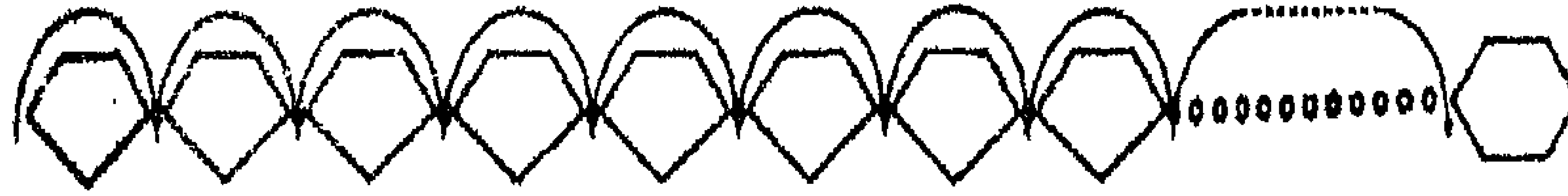
2-8-6-9Inulase (2.1- D-Fructan fructonhydrolase, Ec. 3.2.1.7)

يحلل الأواصر β-1.2-Fructan لجزيئة الأينولين من النهاية الحاوية على الفركتوز مؤدياً بذلك إلى تحرير الفركتوز تباعاً (شكل 2-49).

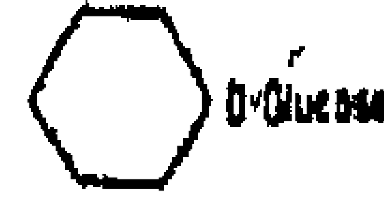
يتخصص هذا الأنزيم للركيزة أنيولين ويؤثر قليلاً في الركائز سكروز، رافنوز وميليزيتوز.

يؤدي إضافة أنزيم السليلاز Cellulsae المحضر تجارياً من Asp. Niger إلى التحلل الكامل للإنيولين لأنه يحوي على نشاط ثانوي لأنزيم الإينولاز Inulase.

يوجد الإنيولاز في الخميرة Saccharomyces إلا أنه لم يتم الإستفادة منه في الصناعة.







مهاجمة الانزيم انيولاز ﺨﺨﺨ الاواصر الكلايكوسيدية

شكل (2- 49) فعالية الانزيم Inulase. يحلل الانزيم الأواصر $\beta-1.2-Fruc\,tan$ لجزيئة الأنيولين من النهاية الحاوية على شكل فركتوز مؤدياً إلى تحرير الفركتوز تباعاً حتى طرف السلسلة الآخر حيث تتحرر ثمالة الكلوكوز الطرفية.

10-6-8-2

poly 1.4-α-D – galacturonide glycanohydrolase, Ec.3.2.1.15 Polygalucturonase

ويدعى أيضاً Polygalacturonidase يحلل هذا الأنزيم الأواصر الفا- 4 الكلايكوسيدية بين ثمالات الكالتكوز للبكتين.

هناك أربعة أنواع من الأنزيم Polygalacturonase توضع في دون مجموعتين Subgroups نسبة إلى تخصصها للركيزة وآلية عملها وهي:

أ- Exo-Polygalacturonidase و ploygalacturonidaseو Polymethylgalacturon-idase

ب- Endo- polygalacturnidase: وتضم Endo- polygalacturonidase و Endo polymethylgalacturonidase.

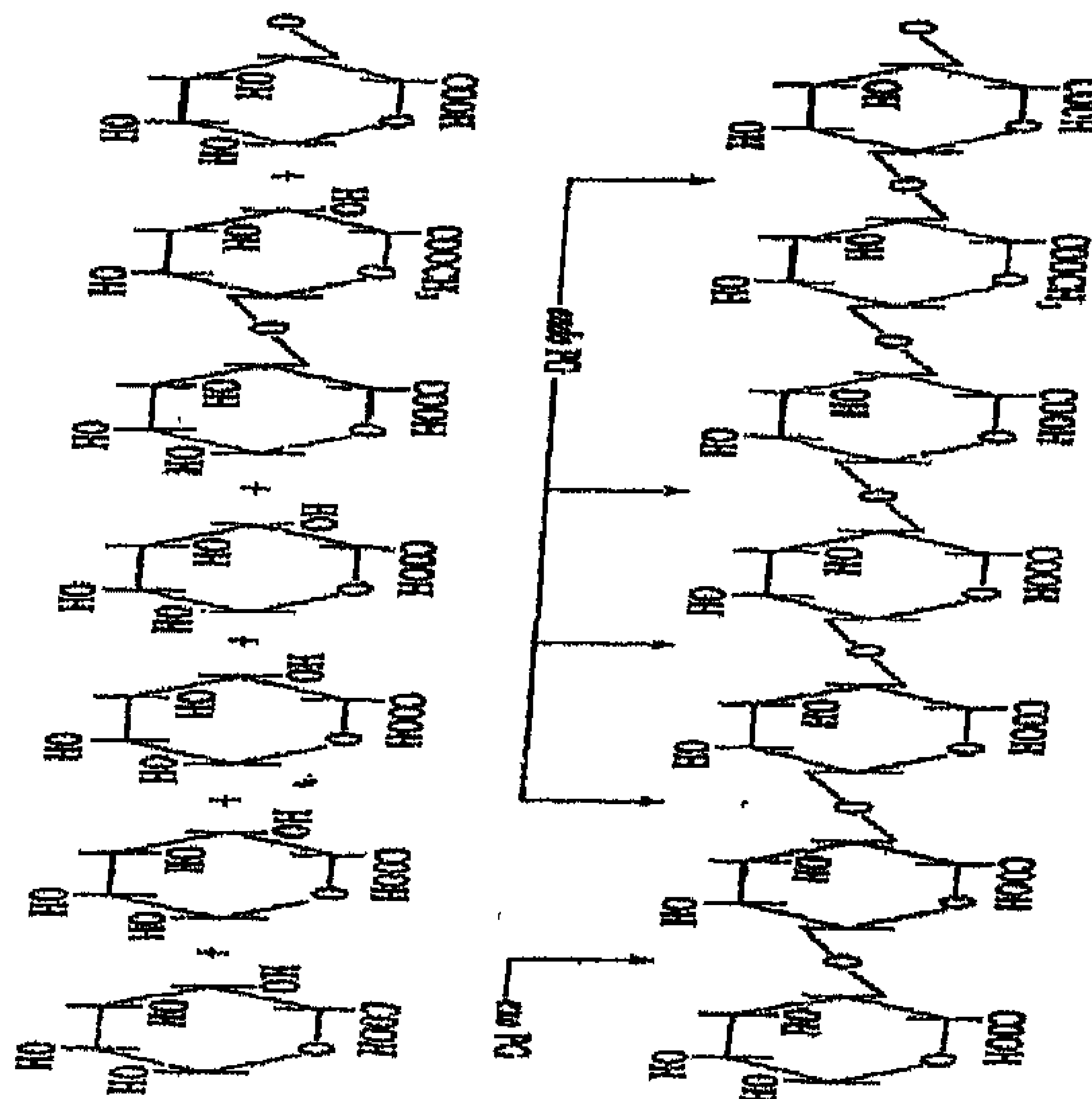
يحلل الأنزيم Exo- polygalaturonidase الأواصر ألفا← 4 القريبة من

ثمالات حامض الكلاكتيورونك Galacturonic الذي يملك مجاميع كربوكسيلية حرة، يتم تحلل هذه الأواصر بشكل متوال من نهايات جزيئة البكتين مؤدياً إلى تحرر حامض الكلاكتيورنك.

أما الأنزيم Exo-polymethylgalacturonidase فإنه يحلل الأواصر ألفا 1—4 القريبة من ثمالات حامض الكلاكتيورونك المؤسترة بالمثيل وعلى التوالي أيضاً من نهايات جزيئات البكتين محرراً بذلك Methylgalacturonates.

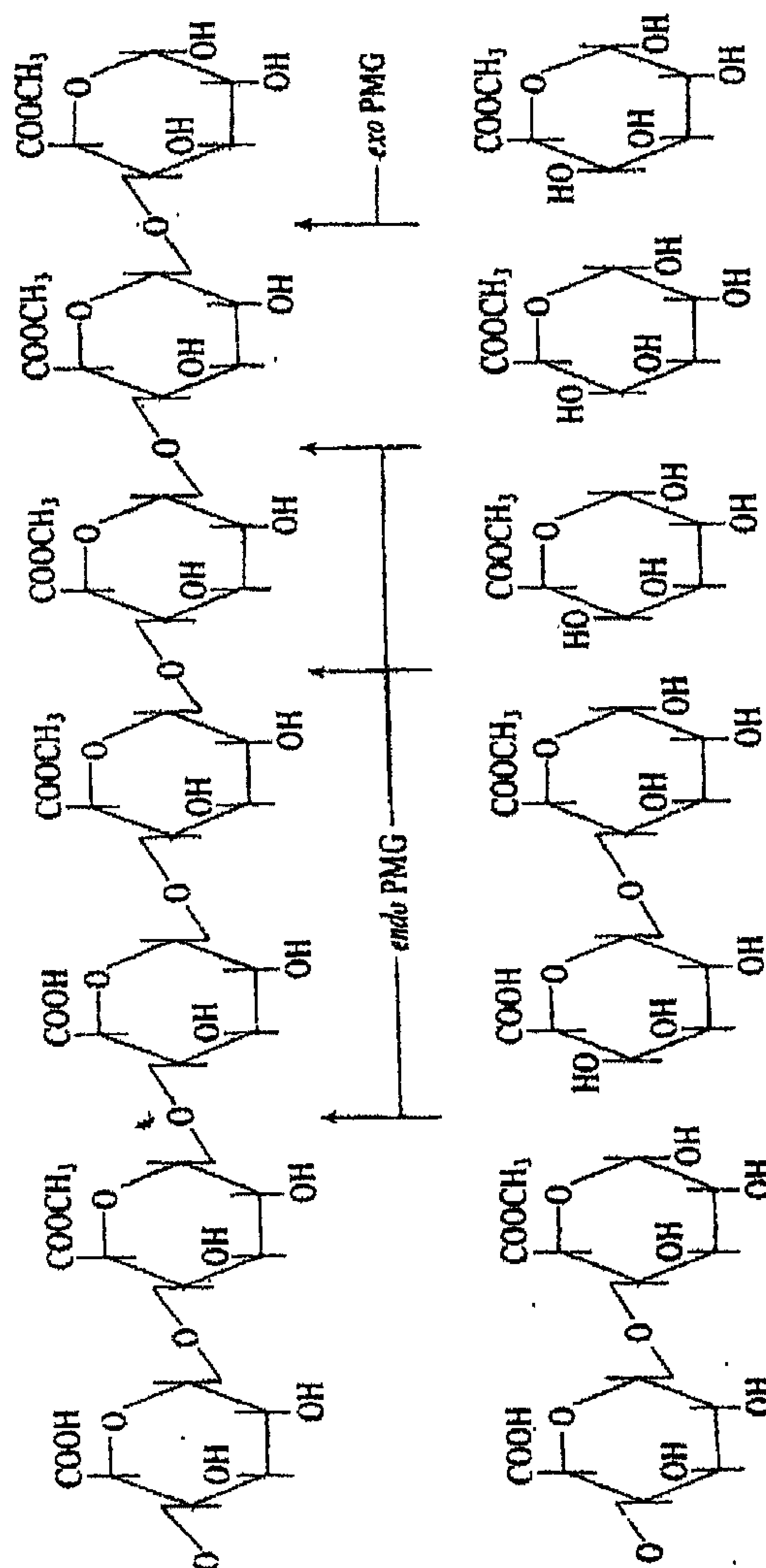
أما الأنزيمات المنتمية لدون المجموعة Endo- polygalacturonidase فإنها تختلف عن سابقتها من حيث تحليلها للأواصر ألفا 1 ← 4 بشكل عشوائي.

يحلل الأنزيم Endo- polygalacturonidase الأواصر ألفا 1 ←4 بين ثمالات حامض الكلاكتيورونك الذي يمتلك مجاميع كربوكسيل حرة مؤدياً إلى تحول البكتين إلى قطع من Oligogalacturonides ذات أوزان جزيئية واطئة.



شكل (2- 50) الفعالية التحفيزية لكل من الانزيمين endo PG و Endopolygalacturonidase exo- PG Expoplygalacturonidase في البكتين.

أما الأنزيم Endo Polymethylgalacturonidase- فإنه يحلل الأواصر ألفا 1—4 بين ثمالات حامض الكلاكتيورونك التي تكون مجاميع الكربوكسيل فيها مؤسترة بالمثيل وبالتالي تتحول جزيئة البكتين إلى Oligogalacturonides ذات أوزان جزيئية واطئة. يوضح الشكلان (2–50) و(2–51) الأنواع الأربعة المذكورة للتفاعلات الأنزيمية هذه إن مصادر الأنزيمات Polygalacturonidases هي النباتات الزهرية (الطماطا ، الجزر، القرع، الفجل) والعفن Asp.niger والخميرة fragilis Saccharomyces والبكتريا Erwinia sp.Klebsiella sp. يحوي المصدر الواحد عادة الأنزيمات المختلفة بإستثناء القليل منها كالخميرة Fragilis Sacch. التي تحوي فقط الأنزيم Endo-polygalacturonidase وعلى الأغلب فإن الأحياء المجهرية تنتج الأنزيمات المختلفة التي تحلل البكتين. إن درجة الحرارة المثلى للأنزيمات المحللة للبكتين مهمة جدا من الناحية التكنولوجية فعند ترويق عصير الفواكه مثلاً يحبذ رفع درجة الحرارة في أثناء العملية وان درجة الحرارة المثلى للأنزيم Polygalacturonase من العفن Asp. Niger هي 45°م في الرقم الهيدروجيني 5.5 إلا أن الأنزيم يبقى فعالاً وبصورة جيدة في درجة 60°م.



شكل (2- 51) الفعالية التحضيرية لكل من الانزيمين endo PMG
Endopolygalacturonidase و exo- PMG Expoplygalacturonidase في
البكتين.

من أقوى المنشطات لهذه الأنزيمات هو المركب Rubidium choloride وتستخدم الأنزيمات المحللة للبكتين هذه في مجال تصنيع الفواكه وفي تحضير

عصير الفواكه والجلي وتحضر صناعياً عادة من أنواع العفن: Aspergillus و Penicillium.

2-8-6-10 β-1.4-Gludcan 4-glucanhydolase E.C.3.2.1.4)Gellulase

يحفز السليلاز Cellulase التفاعل الآتي:



$$\text{Cellulose} \xrightarrow{\text{Cellulase}} \text{Cellulodextrins} + \text{Glucose}$$

إن استعمال هذا الأنزيم ضيق حالياً في صناعات الأغذية ومن فوائده إذابة وتسكر Saccharifying السليلوز في الأغذية ذات الألياف الكثيرة وبذلك تصبح أكثر استساغة. كما استخدم هذا الأنزيم لترويق العصير كعصير الحمضيات والفواكه الأخرى عندما يكون تضبب العصير ناتجاً عن السليلوز.

2-8- 7 الأنزيمات المحللة للأواصر الببتيدية Peptide hydrolases

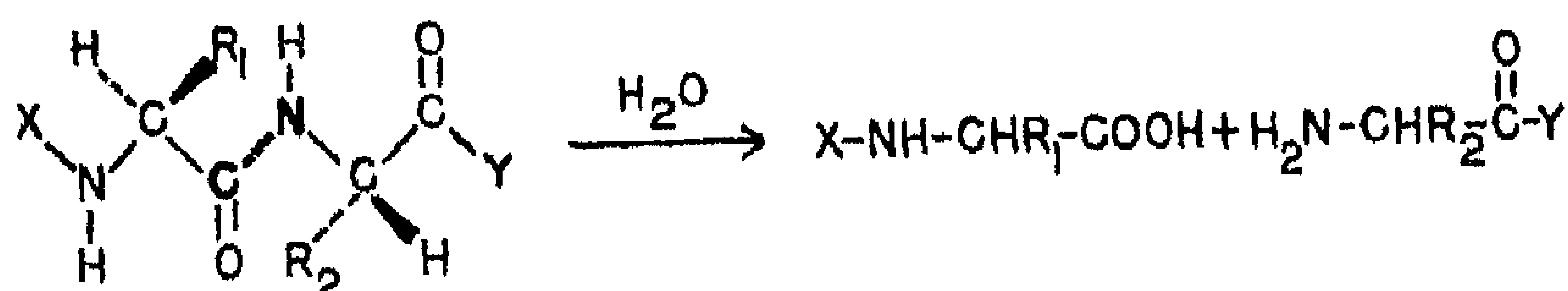
تعطى هذه الأنزيمات رقم الشفرة EC 3.4 تبعاً للتصنيف النظامي للأنزيمات، وتحفز التحلل المائي للأواصر الببتيدية وتعطى الأسماء الشائعة بروتيازات Proteases عندما تحفز التحلل المائي للبروتينات فيما تعمل الببتيدازات على الببتيدات.

تشكل هذه الأنزيمات أهمية خاصة لعلماء التغذية. إن الأنزيمات ببسين Pepsin وتربسين Trypsin وكيموتربسين Chymotrypsin وCarboxypepetidase و Aminopep- tidase مسؤولة عن التحلل المائي للبروتينات التي يتناولها الإنسان إذ تحولها في القناة الهضمية للإنسان إلى أحماض أمينية. كما أن بعض الأنزيمات المحللة للبروتينات مسؤولة عن تخثر الدم ويوجد البعض من هذه الأنزيمات في الخلايا البلعمية Phagocytic cells التي تبتلع الأجسام الغريبة وتكون مسؤولة عن التحلل المائي للبروتينات الغريبة.

تحتـوي الخلايـا حقيقـة النـواة Eucaryotes في عـضيات اللايـسوزوم Lysosomes على عدد من الأنزيمات المحللة للبروتينات فمثلاً يكون أنزيم الـ Cathepsin مسؤولاً عن تقويض Catabolism بروتينات الخلية.

إن الأنزيمات المحللة للبروتينات من أهم المجاميع الأنزيمية في تصنيع الأغذية حيث تستعمل في إنتاج الجبن وتطرية اللحم Meat tenderization وتحوير صفات بروتينات الحبوب في الخبز.

يمكن تمثيل التفاعل العام المحفز بالأنزيمات المحللة للأواصر الببتيدية كما يأتي:



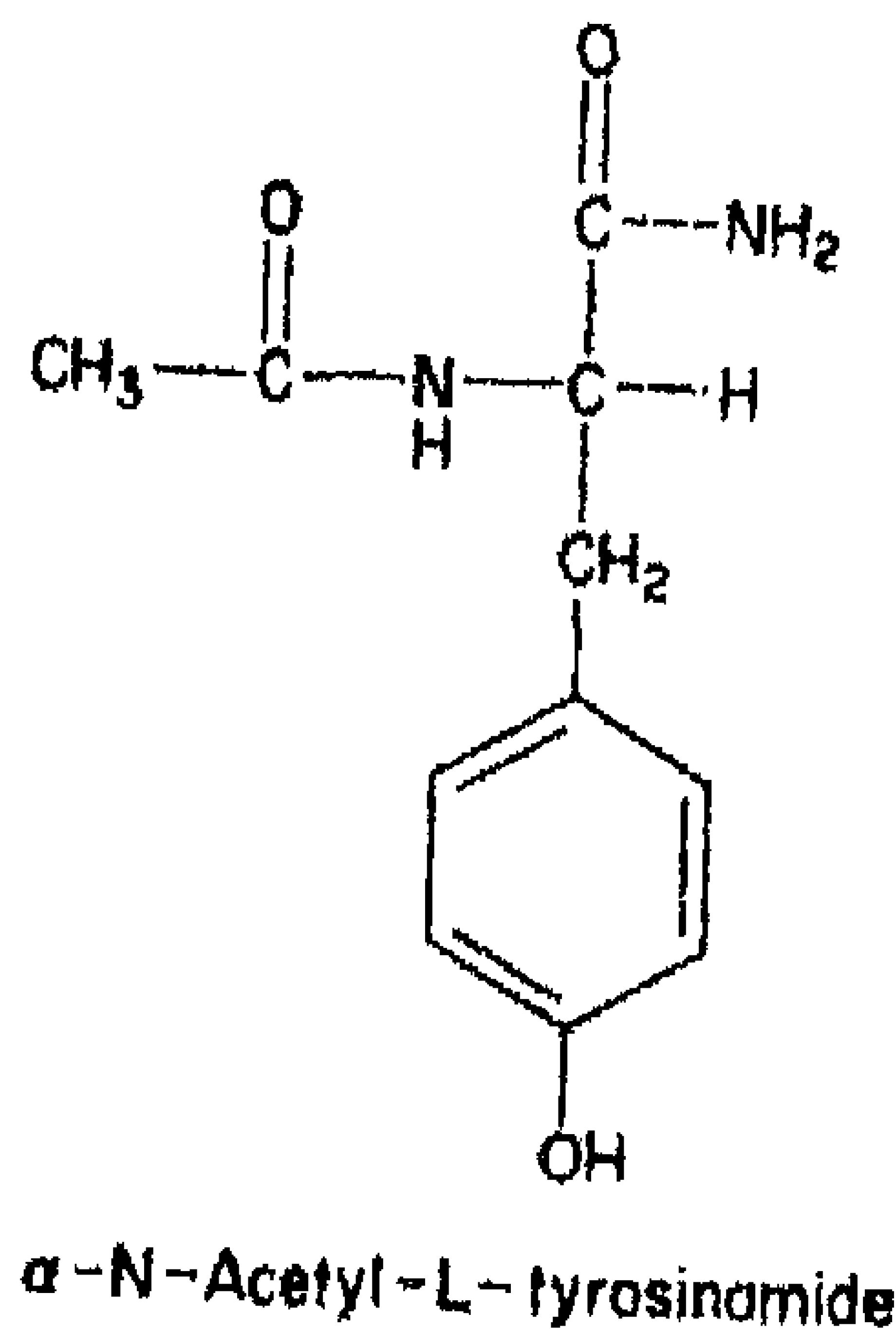
(70 -2) ...

2-8-7-1 تخصص الأنزيمات المحللة للأواصر الببتيدية

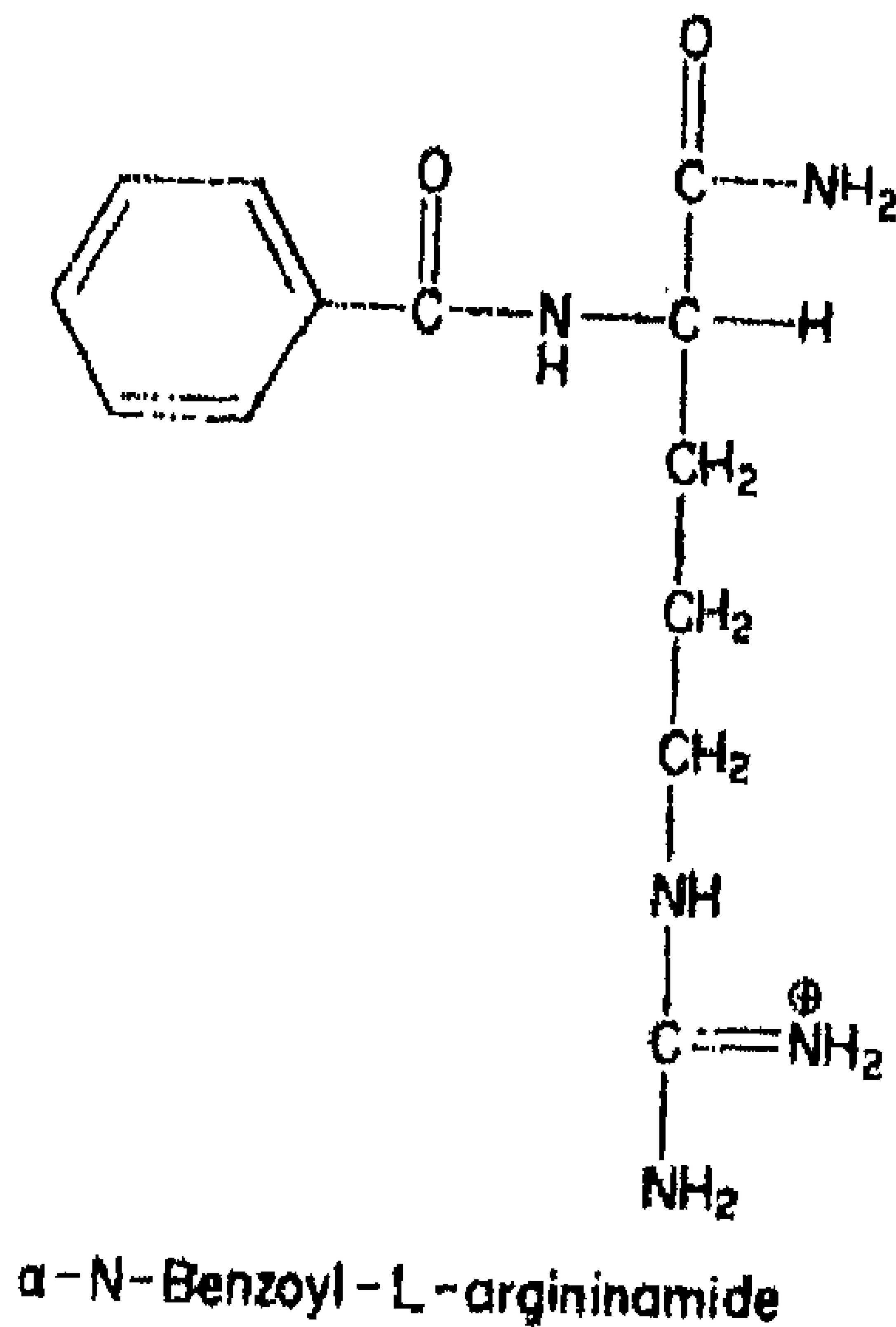
لتحليل الأواصر الببتيدية مائياً يجب توفر بعض الشروط في الركيزة فمثلاً يعتمد تحلل الآصرة على طبيعة المجاميع الجانبية R_1 أو R_2 (معادلة 2-70) أو على شاكلة معينة للأحماض الأمينية فمثلاً الشاكلة (L-). كما قد تتطلب بعض الأنزيمات طبيعية كيميائية معينة لـ X وY (معادلة 2-70) كأن تكون هدروجين وهدروكسيل على التوالي وهلم جرا. أما حجم الركيزة فإنه غير مهم لعديد من أنزيمات البروتياز. ولتوضيح ما جاء أعلاه، نجد مثلا أن الأنزيم Chymotrypsin يحلل الأواصر الببتيدية إذا كانت R_1 (معادلة 2-70) السلسلة الجانبية لثمالة Tyrosyl و phenylalnyl و Troptophanyl أما التريسين فيتطلب

أن تكـون R_1 السلسلة الجانبيـة للارجـنين أو اللايـسين (الأحمـاض الأمينيـة اللاقاعدية) ومـن ناحيـة أخـرى فإن للبيـسين والكاربوكـسي ببتيـداز خصوصية تجـاه R_2 حيـث أن كـلا الأنـزيمين يحلـل الأصـرة الببيتديـة بسرعة عاليـة عنـدما تكون R_2 سلسلة جانبية للفنيل الانـين وجميـع مـا ذكـر مـن الأنزيمـات يتطلـب أن تكـون الأحمـاض الأمينيـة ذات الـشاكلة L أي L-Amino acids أي الـصيغة شائعة الوجود في الطبيعة.

أمـا حجـم الركيـزة فإنـه لـيس بـذي أهميـة لعـدد مـن أنزيمـات البروتيـاز وكمثـال التربـسين والفـا- كيموتربـسين اللـذين تقـدر فعاليتهمـا في المختـبر باستخدام الركيـزتين -α-N- Acetyl L- yrosinamide و -L- argininamide α-N- benzoyl على التوالي (شكل 2-52)



α-N-Acetyl-L-tyrosinamide



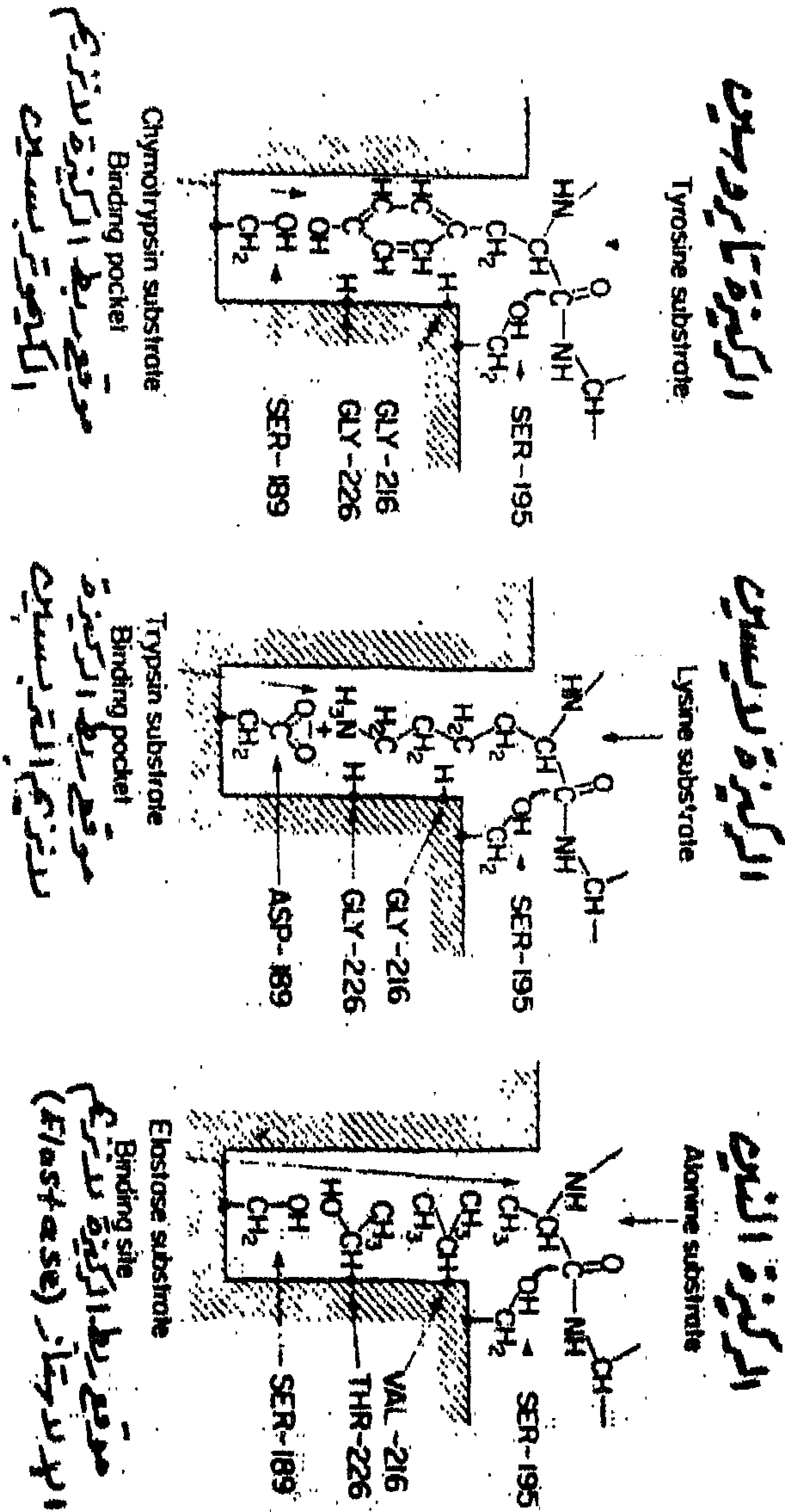
α-N-Benzoyl-L-argininamide

شكل (2- 52) تركيب $\alpha = N - benzoyl - L - \arg ininamide$ و $\alpha - N - Acetyl - L - tyro\sin amide$ وهما ركيزتان للتربسين والكيموتريسين على التوالي.

وكما يلاحظ فإن كلتا الركيزتين المذكورتين يحتوي على حامض أميني واحد ولكن طبيعة مجموعة R_1(انظرالمعادلة 2-70) والشاكلة L للحامض الأميني موجودة ومشروطة لعمل كل من الأنزيمين، وهكذا نجد ثمالة ارجنيل Arginyl في التربسين وثمالة تايروسيل Tyrosyl في ركيزة الألفا- كيموتريسين إلا ان هناك عدداً من أنزيمات البروتياز تظهر متطلبات دقيقة بالنسبة لحجم الركيزة كما في البروتيازات الحامضية Acid proteases وسوف نأتي على ذكرها فيما بعد.

إن الإختلاف في تخصص أنزيمات البروتياز المختلفة يعود لطبعية ثمالات الربط Biniding residues الموجودة في الموقع النشط للأنزيم التي يتم من خلالها ارتباطه بالركيزة.

لو نظرنا إلى الشكل (2-53) وقارنا تسلسل الأحماض الأمينية في منطقة الموقع النشط للأنزيمات الفا- كيموتريسين وايلاستاز، لوجدنا بأن (جيب الإرتباط) Binding pocket يكون مفتوحاً تماماً في الالفا- كيمو تريسين والتربسين لوجود ثمالات كلايسين في الموقع 216 (Gly-216) والموقع 226 (Gly-226) لذا فأن السلاسل الجانبية الكبيرة لثمالات الأحماض الأمينية تلائم هذه الجيوب ويختلف الأنزيمان من حيث أن التربسين يمتلك Asp-189 في أسفل الجيب بينما يحتوي الألفا- كيموتريسين على Ser-189. إن الشحنة السالبة لمجموعة كاربوكسيل 189- Asp في التربسين، تؤدي إلى تكوين آصرة كهرستاتية Electrostatic مع الشحنة السالبة لمجموعة ايبسلون- امينو Amino-E لثمالة الحامضي الأميني لايسين في الركيزة.



شكل (2- 53) المواقع المفترضة لارتباط الركائز بالانزيمات الفا- كيموتريبسين وتريبسين وايلاستاز **Elastase**.

إما جيب الإرتباط في الأنزيم ايلاستاز Elostase فمختلف تماماً (شكل 2-52)، إذ يمتلىء الجيب بالسلاسل الجانبية الكبيرة لكل من الحامضين Val-216 و 226Thr وبذلك يتلاءم جيب أنزيم الايلاستار مع السلاسل الجانبية الصغيرة وكمثال CH_3 – ولهذا السبب يعود تخصص الأنزيم نحو ركائز تحوى الانين.

2-8-7-2 دون أقسام الأنزيمات المحللة للبروتينات، "بروتيازات"

Subdivision of Proteases

يمكن تقسيم الأنزيمات المحللة للبروتينات إلى أربع مجاميع استناداً إلى آلية عملها:

أ- بروتيازات السرين ب- بروتيازات السلفهدريل

جـ- أنزيمات البروتياز الحاوية على المعادن د- البروتيازات الحامضية

أ- بروتيازات السرين Serine proteases

الصفات العامة:

تضم بروتيازات السرين أنزيمات العائلة كيموتربسين – 8-and، α-chymotrypsin وكذلك الايلاستاز Elastase والثرومبين Thrombin والسبتلزين Subtilisin وأخيراً Lytic protease-x من أنواع السورانجيوم Sorangium sp. تتميز جميع هذه الأنزيمات بإمكانية تثبيطها بالمركب (DFP)Diisopropylfluorophosphate الذي يتفاعل مع مجموعة الهدروكسيل لثمالة السرين في الموقع النشط للأنزيم. تعد جميع هذه الأنزيمات Endopeptidases لإنها تحلل مائياً أواصر داخلية في جزيئة الركيزة. تحتوي هذه الأنزيمات في موقعها النشط إضافة إلى لسرين، على ثمالة هستدين أيضاً ويمكن ملاحظة ثمالات الأحماض الأمينية حول ثمالات السرين والهستدين لعدد من الأنزيمات في الجدول (2-15).

جدول ٢ – ١٥ : تسلسل الاحماض الامينية حول ثمالات السريل serylوالهستديل Histidyl الجوهرية في الموقع النشط لعدد من الانزيمات

Enzyme	Sequence
	Around Seryl Residue
Trypsin, bovine	-Asp-Ser-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser*-Gly-Gly-Pro-Val-Val-Cys-Ser-
Trypsin, pig	-Asn-Ser-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser*-Gly-Gly-Pro-Val-Val-Cys-Gly-
Chymotrypsin A, bovine	-Ser-Ser-Cys-Met-Gly-Asp-Ser*-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Lys-
Chymotrypsin B, bovine	-Ser-Ser-Cys-Met-Gly-Asp-Ser*-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Gln-
Elastase, pig	-Ser-Gly-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser*-Gly-Gly-Pro-Leu-His-Cys-Leu-
Thrombin, bovine	-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser*-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-
α-Lytic protease, *Sorangium*	-Asp-Ser*-Gly-Gly-
Subtilisin, *B. subtilis* carlsberg	-Ala-Thr-Leu-Asn-Gly-Thr-Ser*-Met-Ala-Ser-Pro-His-Val-Ala-
Alkaline phosphatase, *E. coli*	-Pro-Asp-Tyr-Val-Thr-Asp-Ser*-Ala-Ala-Ser-Ala-
Phosphoglucomutase, rabbit	-Asx-Leu-Gly-Val-Thr-Ala-Ser*-His-Asx-Gly-Glx-Ser-Ala-Gly-
	Around Histidyl Residue
Trypsin, bovine	-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His*-Cys-Tyr-Lys-Ser-Gly-Ile-Gln-
Chymotrypsin A, bovine	-Val-Val-Thr-Ala-Ala-His*-Cys-Gly-Val-Thr-Thr-Ser-Asp-
Chymotrypsin B, bovine	-Val-Val-Thr-Ala-Ala-His*-Cys-Gly-Val-Thr-Thr-Ser-Asp-
Elastase, pig	-Val-Met-Thr-Ala-Ala-His*-Cys-Val-Asp-Arg-Glu-Leu-Thr-
Thrombin, bovine	-Thr-Ala-Ala-His*-Cys-
α-Lytic protease, *Sorangium*	-Phe-Val-Thr-Ala-Gly-His*-Cys-Gly-Thr-Val-Asn-Ala-

ومن الجدير بالملاحظة هو أن للأنزيمات الثلاثة كيموتربسين وتربسين وايلاستاز مصدارٌ مشتركاً وهو البنكرياس كما أن آلية عملها متشابهة. أما البروثرومبين فإنه يوجد في الدم ويتحول إلى الصيغة الفعالة ثرومبين أثناء تخثر الدم.

أما الأنزيمات الميكروبية Subtilisin و α- Lytic protease فإنها مشابهة للكيموتربسين.

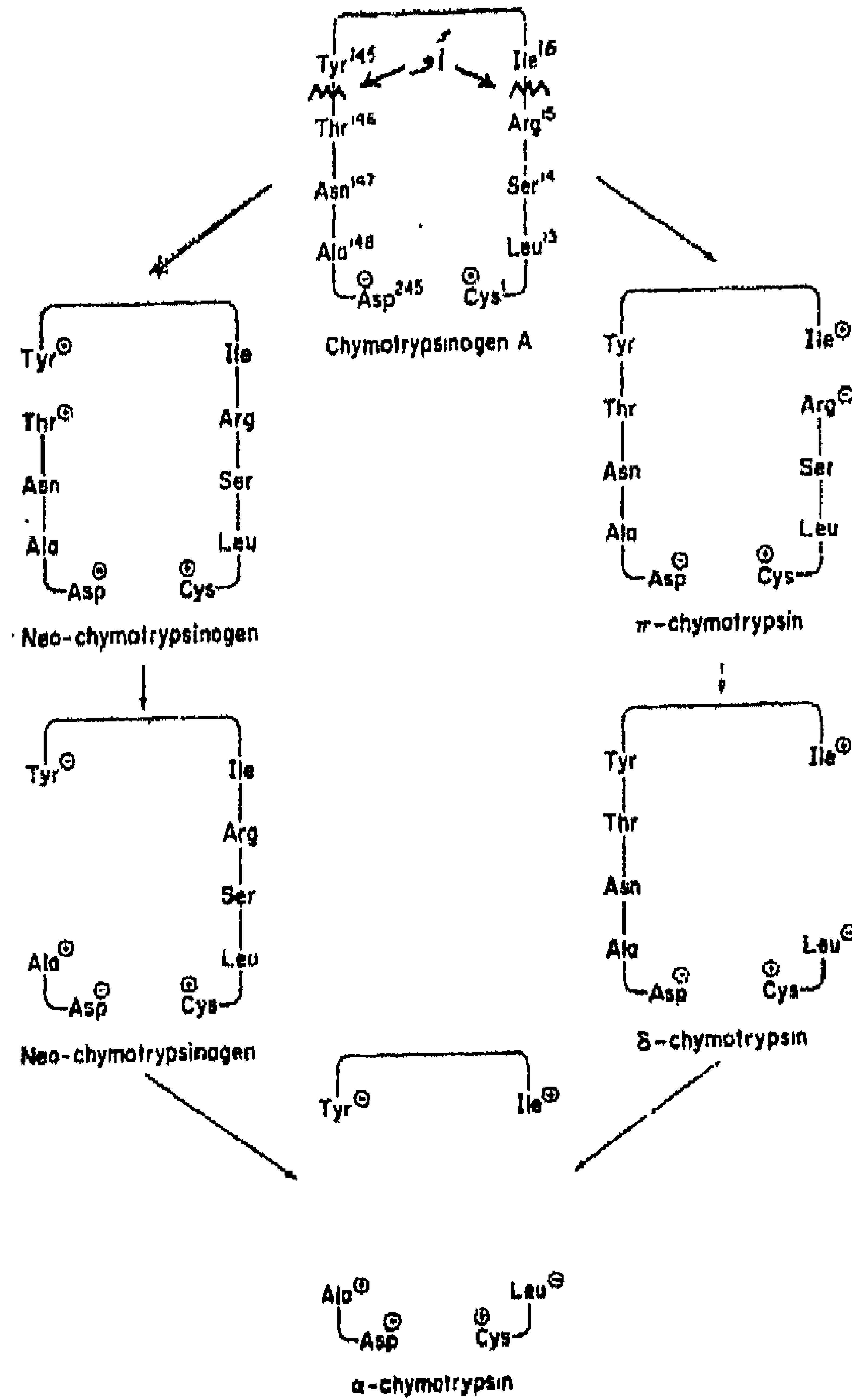
الفا- كيموتربسين α- Chymotrypsin

ينتج بنكرياس الأبقار نوعين من المولدات الأنزيمية zymogens وهي chymotrypsinogen A وchymotrypsinogen B. يختلف هذان المولدان الأنزيميان عن بعضهما في تركيبهما من الأحماض الأمينية مما يؤدي إلى اختلاف نقطة تساوي تكهربهما Isoelectric points فهي 8.5 للكيموتربسينوجين (A) و 4.5 للكيموتربسينوجين (B)، وعند تحولهما إلى الأنزيمين الفعالين الفا- كيموتربسين وبيتا- كيموتربسين، يتم اقتطاع بعض الأجزاء الببتيدية إلا أن بعض الإختلافات تبقى في الخصائص الفيزيائية، أما شروط تخصصهما فهي واحدة.

ينتج بنكرياس الخنزير إضافة إلى كيوتربسينوجبين (A) و(B)، مولداً أنزيمياً آخر وهو chymotrypsinogen C ويكون تنشيطه بواسطة التريسين إلى الكيموتربسين C. يتخصص الكيموتربسين C تجاه السلسلة الجانبية Leucyl على خلاف الفا- وبيتا- كيموتربسين المتخصصين تجاه الأحماض الأمينية الأروماتية.

يمكن توضيح تحول كيموتربسينوجين A إلى الفا- كيمو تربسين في الشكل (2-54). يتكون الكيموتربسينوجين A من سلسلة ببتيدية واحدة بوزن جزيئي 25.000. تحتوي هذه السلسلة على 245 حامض أميني وخمس أواصر ثنائية الكبريتيد.

إن تحول الكيموتربسينوجين A إلى الفا- كيموتربسين، عملية مقعدة على الرغم من أن تحلل آصرة ببتيدية واحدة قد يؤدي إلى تنشيط الأنزيم. فعند معاملة كيموتربسينوجين A بأنزيم التربسين، تتحلل الآصرة بين ثمالتي Arg-15 و Ile-16 وينتج عن ذلك تغيرات في الهيأة الأنزيمية مؤدية إلى وضع كل من الحامضين الأمينيين Ser-195 و His-57 في الموقع النشط لتكوين π- chymotrypsin الذي يكون تام الفعالية. يتكون π-chymotrypsin من سلسلتين ببتيديتين مرتبطتين بأواصر ثنائية الكبريتيد (شكل 2- 54).



شكل (2- 54) مخطط يوضح تحول الكيموتريسينوجين A إلى باي ودلتا وألفا- كيموتريسين $TT-\delta Chymotryp\sin$ and α لاحظ ضرورة التحلل المائي للآصرة الببتيدية بين ثمالي Arg-15 و Ile- 16 بواسطة البريسين لتنشيط المولد الانزيمي كيموتريسينوكجين. يعمل الدلتا – كيموتريسين $\delta-Chymotry\sin$ على تحول كيموتريسينوجين A إلى نوعيم من المولد الانزيمي غير الفعال Neo- Chymotrypsinogen.

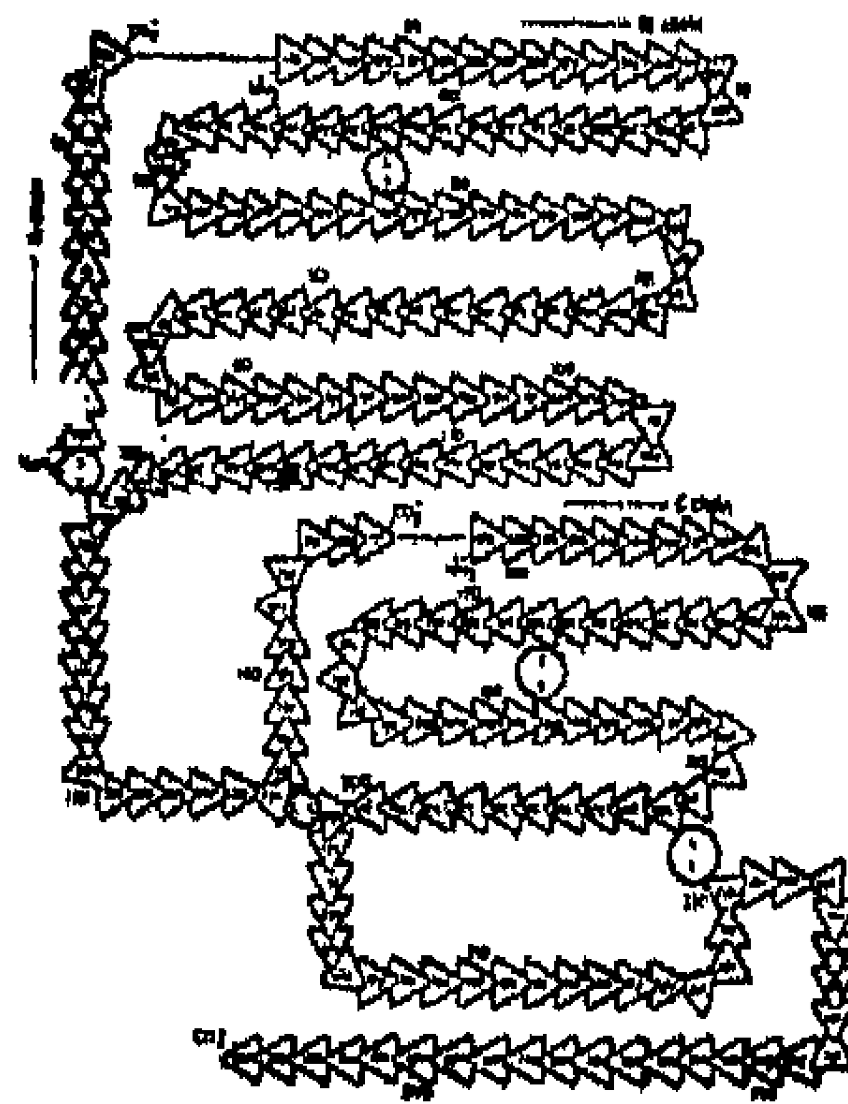
يتحــول TT-Chymotrypsin إلى δ -Chymotrypsin بتحلــل الآصــرة الببتيدية ذاتيا بين Leu-13 وArg-15 (شـكل 2-54). يحتـوي 8Chymotrypsin

إذن على جميع الأحماض الأمينية الموجودة في المولد الأنزيمي كيموتريسينوجين (A) باستثناء الأرجنين والسرين ويتكون من سلسلتين ببتيديتين.

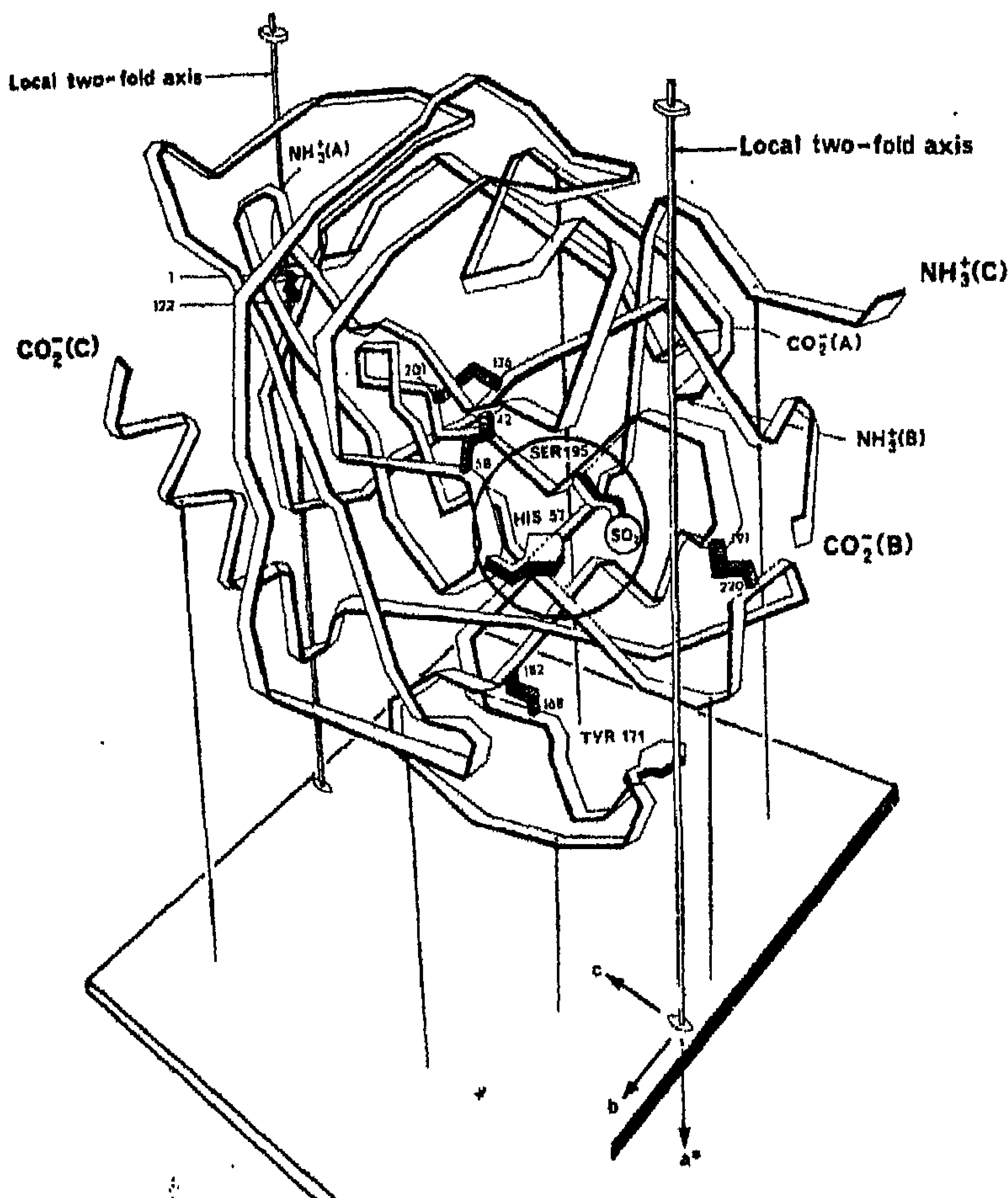
يستمر التحلل الذاتي Autolysis للدلتا δ كيموتريسين وتنشطر الآصرتان Tyr -145-Thr-146 و Asn -147--------Ala -148 وبذلك يتحرر الببتيد الثنائي Thr -146-----Asn -147 ويتكون بذلك الألفا- كيموتريسين وهو أكثر الكيموتريسينات استقرارا. يتكون الفا-كيموتريسين من ثلاث سلاسل ببتيدية يتصل بعضها ببعض بواسطة أواصر ثنائية الكبريتيد بينية Interchain disulifide bonds.

يمكن للكيموتريسينوجين A(شكل 2-54) أن يتحول إلى نوعين من المولد الأنزيمي غير النشط Neo -Chymotrypsinogen بالفعل التحفيزي للدلتا- كيموتريسين.

يوضح الشكل (2-55) تسلسل الأحماض الأمينية في الألفا- كيموتريسين امكن تعيين التركيب ثلاثي الأبعاد للألفا- كيموتريسين بطريقة X- ray Chrystallogrophv وهي كما في الشكل (2-56).



شكل (2- 55) تسلسل الأحماض الأمينية في الألفا- كيموتريسين. الترقيم المستخدم يعود للمولد الانزيمي كيموتريسينوجين A. ان الانقطاع بين الثمالات 13- 16 و 146-149 يعود لاقتطاع زوج من ثنائي الببتيد عند التنشيط.



شكل (2- 56) مخطط مصرو يمثل هيأة السلاسل الثلاث Aو Bو C لعديد من الببيتيد لانزيم الفا – كيموتريسين. لاحظ مواقع الجسور ثنائية الكبريتيد بين أزواج الثمالات الاتية 1- 122، 136- 201، 42- 58، 168- 182و 0191- 220 يتضح في الصور موقع النهايات الأمينية والكربوكسيلية وكذلك الثمالات Tyr 171، His- 57.

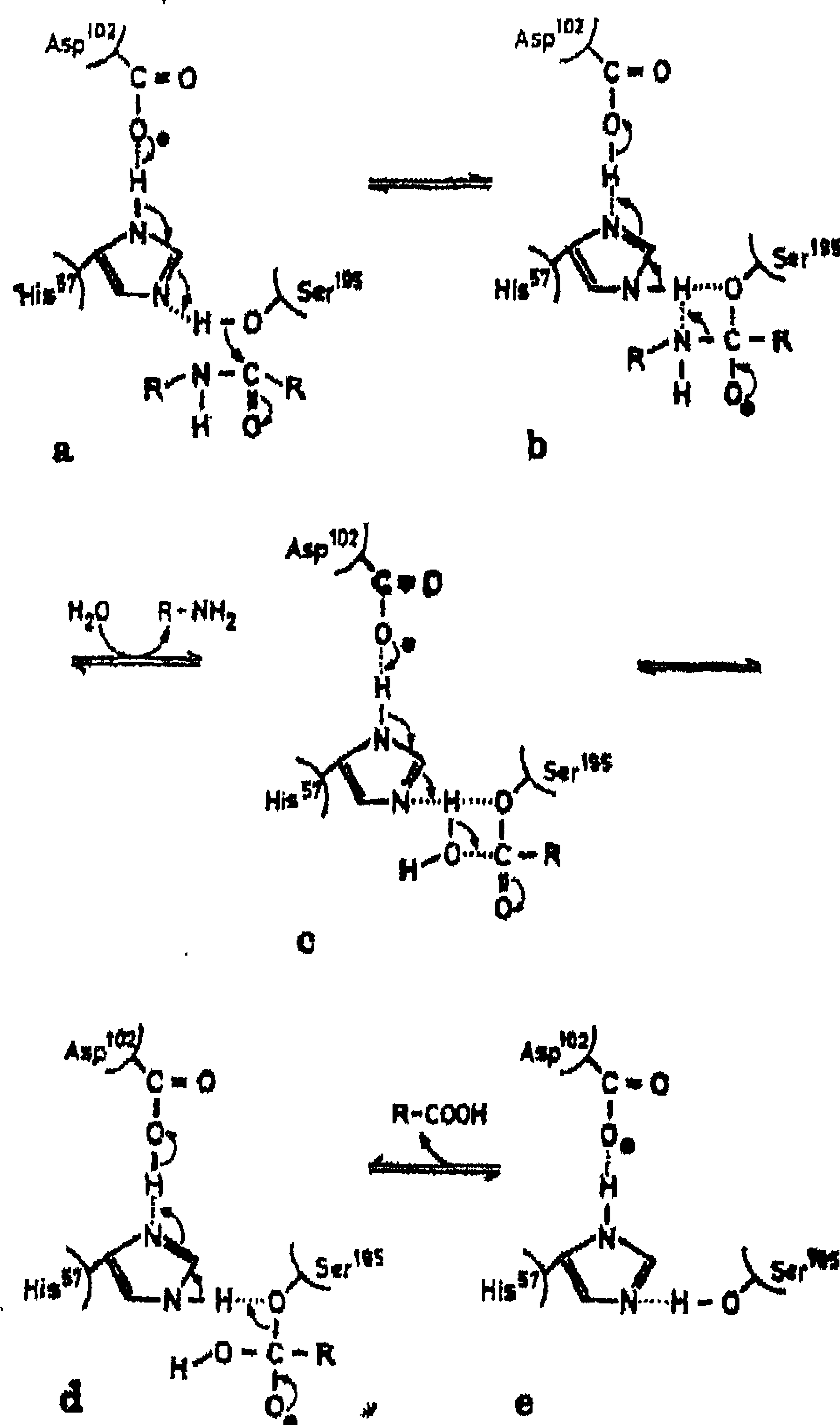
يتضح من الشكل بأن جميع النهايات الكربوكسيلية والأمينية الناتجة من تحول الكيموتريسينوجين Aإلى الألفا- كيموتريسين واقعة في الجهة اليمنى من الصورة. وتحتوي السلاسل A وB C على 13 و130 و98 ثمالة حامض اميني على التوالي.

آلية عمل الكيموتربسين:

يعتمد نشاط الأنزيم على His-57 و Ser-195(شكل 2-56) إذ يقتربان من بعضهما في الموقع النشط للأنزيم نتيجة لإلتواء السلسلة الببتيدية. إن 102-Asp الذي يوجد في محيط كارة للماء (هدروفوبي) يستطيع نتيجة لتموضعه هذا أن يستقطب مجاميع فعالة أخرى. أما His-57 فهو قاعدة قوية يستطيع سحب بروتون من مجموعة الهايدروكسيل العائدة إلى ثمالة Ser-195 كما في الشكل (2-57-أ) ثم إن الهجوم النيوكليوفيلي لثمالة Ser-195 على كربون مجموعة الكربونيل للآصرة الببتيدية في الركيزة، يؤدي إلى تحرير الأمين شكل (2-57-ب) وتكوين معقد اسيل- الأنزيم Acyl- enzyme إن هذا المركب الوسطي غير ثابت (وإلا لما حصل التفاعل بسرعة واضحة) تؤدي ثمالة His-57 وبمساعدة Asp-102 إزالة مجموعة الأسيل، بسحب بروتون من الماء وبذلك تهاجم مجموعة الهدروكسيل الناتجة OH-هجوما نيوكيلوفيليا Neolecophilic attack مجموعة الكاربونيل لمعقد اسيل- الأنزيم (شكل 2-57-جـ) وأخيرا مما تقدم بأن His-57 يعمل مرة بوصفه حامضا عاما General acid Catalyst في خطوة إزالة الاسيل. إن سهولة حدوث الخطوة الأخيرة هذه تتم بتكوين آصرة هيدروجينية بين الهستدين و Asp-102 (انظر 2-57-د). ومن الجدير بالذكر أن جميع هذه التحولات تتم دون حركة أية مجموعة من المجاميع الفعالة في الأنزيم.

ب- بروتيازات السلفهدريل Sulfhydry Proteases

لهذه المجموعة من الأنزيمات القابلية على تحليل الأواصر الببتيدية للبروتينات ويمكن تثبيطها بالكواشف المثبطة لمجموعة السلفهدريل. وتضم هذه المجموعة أنزيمات النباتات الزهرية مثل الأنزيمات Papain و Ficin و Bromelain وأنزيمات الأحياء المجهرية مثل Streptococcus -proteases. يوضح الجدول 2-16 تسلسل الأحماض الأمينية حول السثئين والهستدين لعدد من بروتيازات السلفهدريل.



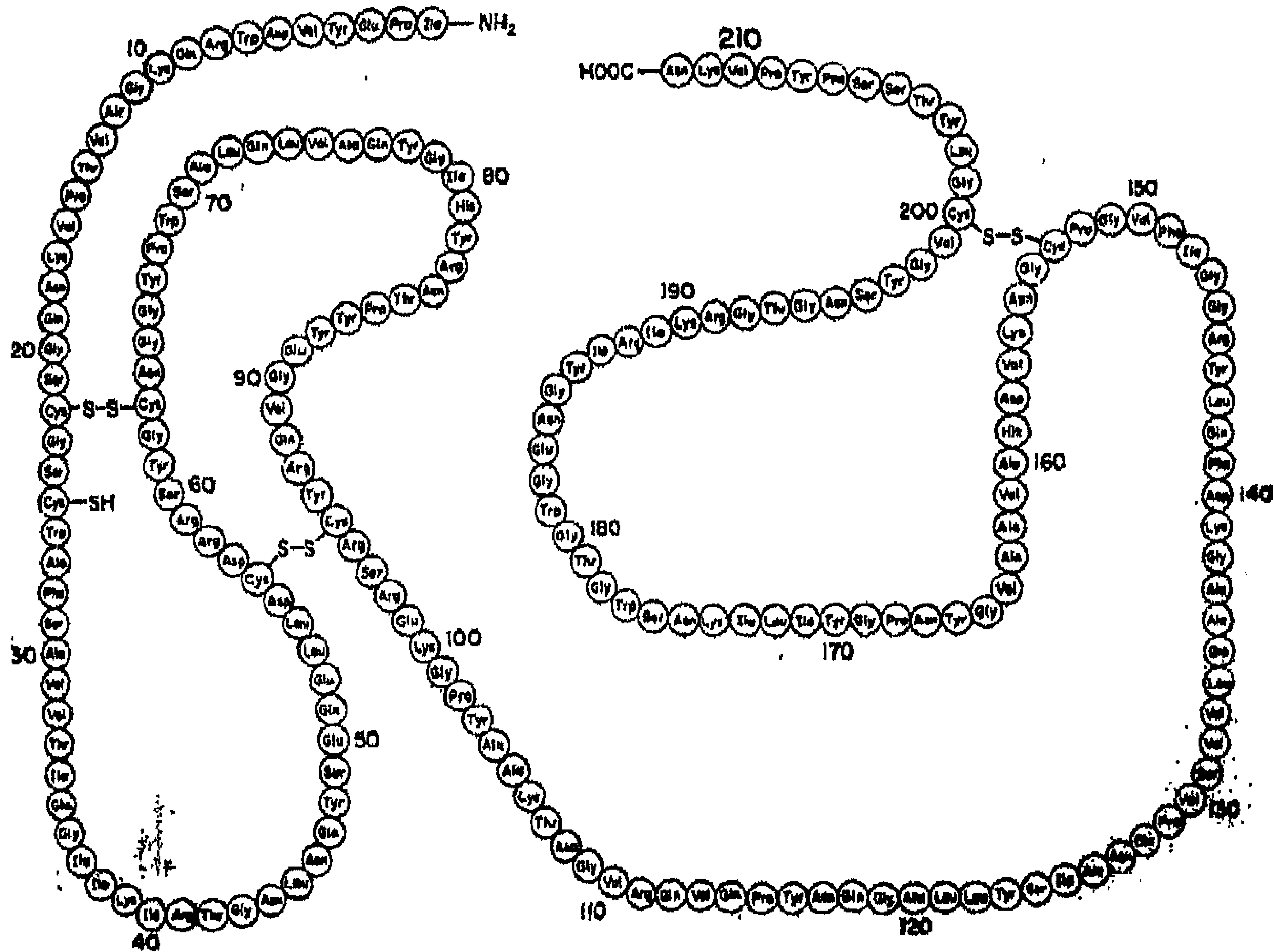
شكل (2- 57) الآلية المقترحة لتفاعل محفز بانزيم كيموتريسين.

تدل الدراسات المختلفة للأنزيم Fapain (البابايا Papaya) والأنزيم Ficin من التين Fig والأنزيم بروملين bromelain من الأناناس pineapple على ان الرقم الهدروجيني الأمثل لعملها واسع المدى ويقع بين 6 و 7.5. وتكون هذه الأنزيمات أيضاً مقاومة لدرجات الحرارة العالية (60-80°م) في الرقم الهدروجيني المتعادل، وتظهر تخصصا واسعا للركيزة. يحلل كل من الـ Papain وال Ficin الركائز الحاوية على Arginine-1 و Glycine L-Lysine و L-Citrulline بنفس الكفاءة تقريبا.

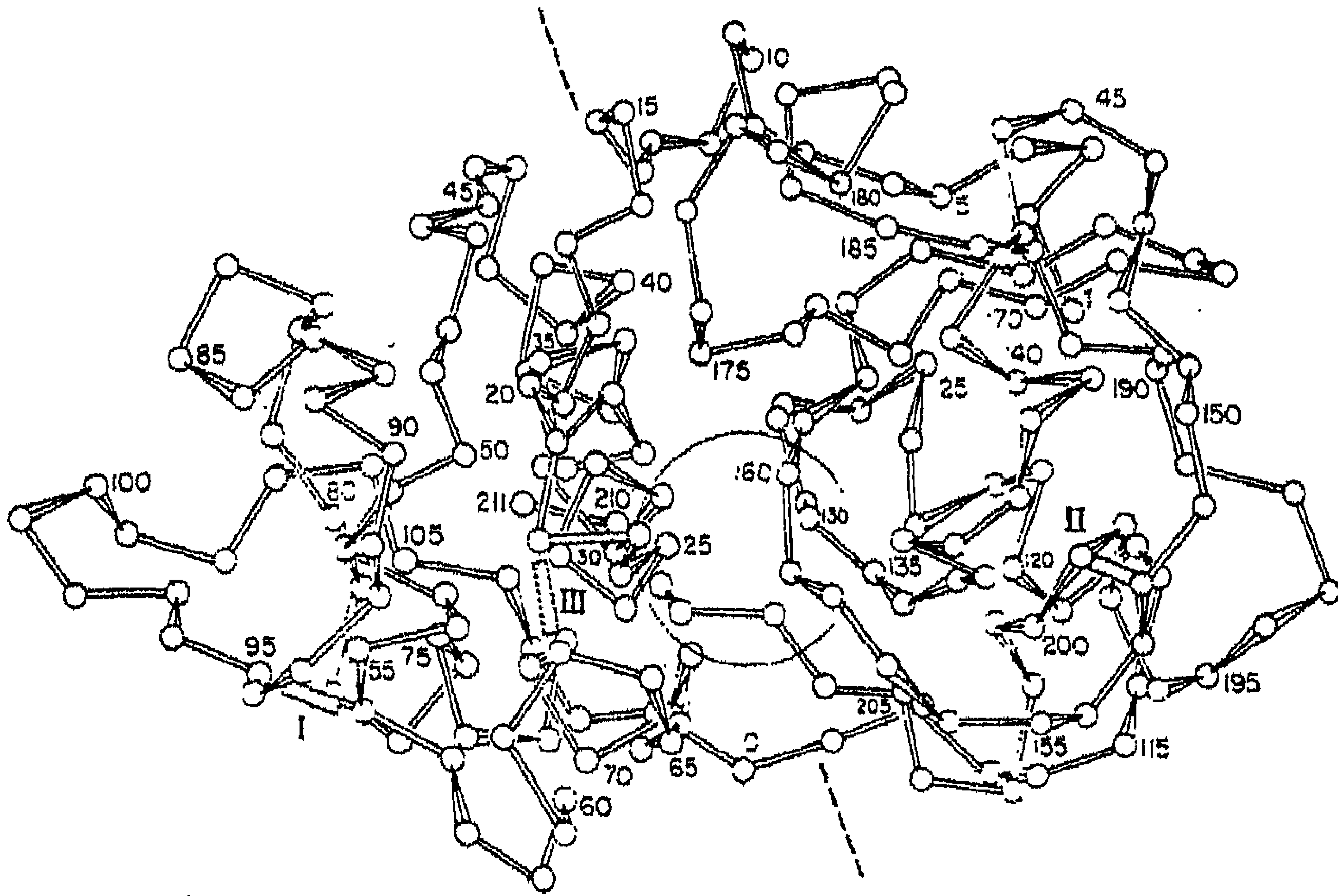
جدول ٢ – ١٦ تسلسل الاحماض الامينية حول مجاميع الاميدازول (ثمالة الهستدين) والسلفهدريل (ثمالة السستئين) الجوهرية لعدد من بروتيازات السلفهدريل Sulfhydryl Proteases

تسلسل الاحماض الامينية	الانزيم
-Asn-Gln-Asp-Pro-Cys-Gly-Ala-Cys*-Trp-	Bromelain, stem
-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly-Ser-Cys-Gly-Ser-Cys*-Trp-	Papain
-Pro-Ile-Arg-Gln-Gln-Gly-Gln-Cys-Gly-Ser-Cys*-Trp-	Ficin
-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys*-Val-	Proteinase, streptococcal
-His*-Ala-Val-Thr-Ala-Ile-Gly-Tyr-	Bromelain, stem
-Val-Gly-Pro-Cys-Gly-Asn-Lys-Val-Asp-His*-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Gly-Tyr-	Papain
-Thr-Gly-Pro-Cys-Gly-Thr-Ser-Leu-Asp-His*-Ala-Val-Ala-Leu-	Ficin
-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His*-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-	Proteinase, streptococcal

يوضح الشكل 2-58 التسلسل الكامل للأحماض الأمينية في أنزيم البابائين Papain. تتكون السلسلة من 212 حامض اميني ووزنها الجزيئي يقارب 23900. تم توضيح التركيب الثالثي للأنزيم بواسطة الأشعة السينية (شكل 2-59). إن للجزيئة اخدودا عميقا يمر قطريا في المركز بحيث تبدو الجزيئة الواحدة وكأنها جزيئتان مع العلم بأن ثلاثة فقط من أجزاء السلسلة الببتيدية تمر في هذا الأخدود. كما أن مجموعة السلفهدريل الجوهرية لثمالة 25- Cys تقع في جهة واحدة من الأخدود (انظر الدائرة في الشكل 2-59). ترتبط الركيزة بتخصص فراغي Stereospecifically في المجاميع الموجودة في الأخدود بحيث تكون الأواصر الببتيدية قيد التحفيز معرضة لمجموعة السفلهدريل وبالقرب منها.



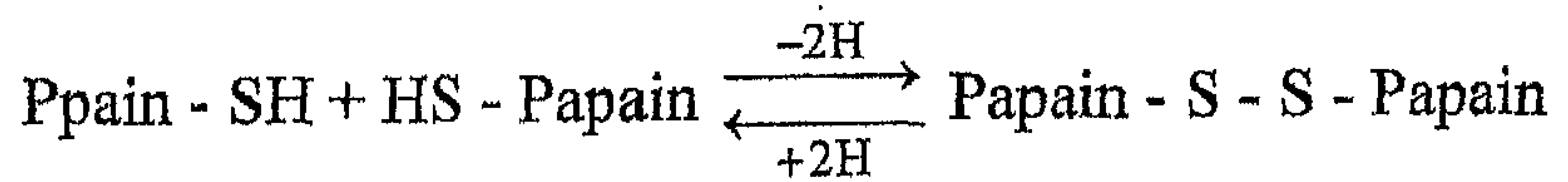
شكل (2- 58) التركيب الأولي لانزيم البابائين



شكل (2- 59) التركيب الثانوي والثالثي لانزيم البابائين <papain

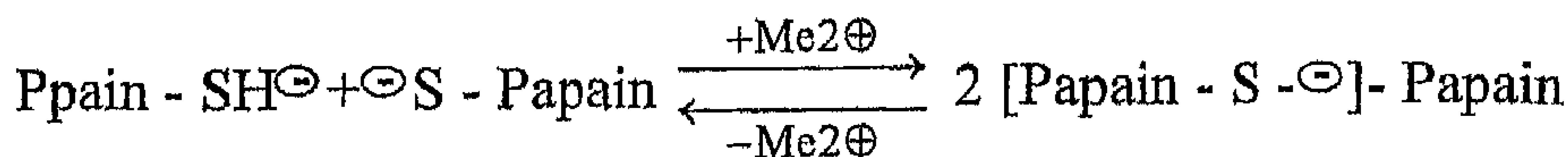
تم الإستدلال عليه باستخدام X-ray Crystallography تمثل الدوائر ذرات الكربون- الفا لثمالات 212 حامض أميني.

يوجد البابائين والكيموبابائين في عصير نبات البطيخ Carica papaya ويمكن تثبيط هذين الأنزيمين بمواد مؤكسدة وبالأيونات الثقيلة مثل pb^{2+} أو Hg^{2+} أما المركبات ستئين Cystein والكلوتاثايون المختزل و HCN فإنها منشطات قوية لهذه الأنزيمات يمكن توضيح تنشيط وتثبيط أنزيمات البابائين والبروملين والفايسين Ficin بالمعادلتين الآتيتين



$$\text{Ppain - SH + HS - Papain} \underset{+2H}{\overset{-2H}{\rightleftharpoons}} \text{Papain - S - S - Papain}$$

غير نشط   نشط أنزيمياً   (71-2000)



$$\text{Ppain - SH}^{\ominus} + {}^{\ominus}\text{S - Papain} \underset{-Me2\oplus}{\overset{+Me2\oplus}{\rightleftarrows}} 2\,[\text{Papain - S -}^{\ominus}]\text{- Papain}$$

غير نشط   نشط أنزيمياً   (72-2000)

ملاحظة Me= معدن Metal

يكون أنزيم البابائين مستقرا عادة في الرقم الهيدروجيني 5.0 إلا أن استقراريته تقل في الرقم 3 وبدرجة كبيرة إذا ازداد الرقم الهيدروجيني عن 11.

عند مقارنة البابائين بالأنزيمات الأخرى نجده أكثرها استقرارية بالحرارة وهو بذلك من أكثر الأنزيمات المحللة للبروتينات استخداما وخاصة لتطرية اللحوم Tenderization ولتحلل البروتينات. ويضاف للغرض نفسه ولكن بكميات أقل أنزيما Bromelain و Ficin.

يستخلص البروملين Bromelain عادة بوصفه ناتجا ثانويا من سيقان نبات الأناناس عند حصاد الأناناس حيث تحجب هذه السيقان بعد قطف فاكهة الأناناس. وتعزل منها الجذور والأوراق. تعصر السيقان وترشح العصارة ثم تستخدم تقنية التجزئة الترسيبية Fractional precipitation بالاستون ويفصل الجزء الغني بالبروملين ويجفف.

أما الأنزيم Ficin فيستخلص عادة بطريقة بزل العصارة من سيقان التين نوع Ficus، ومن هذه العصارة يمكن الحصول على الأنزيم بطريقة التجفيف بالرش (رش العصارة على سطح ساخن) وعندما يراد الحصول على الأنزيم بنقاوة عالية، يمكن ترسيبه بالاستون. يحتوي الأنزيم Ficin الخام المستخرج من عصير التين نوع Ficus على أنزيم البيروكسداز.

جـ. أنزيمات البروتياز الحاوية على المعادن "البروتيازات المعدنية"

Metal -Containing Proteolytic enzymes

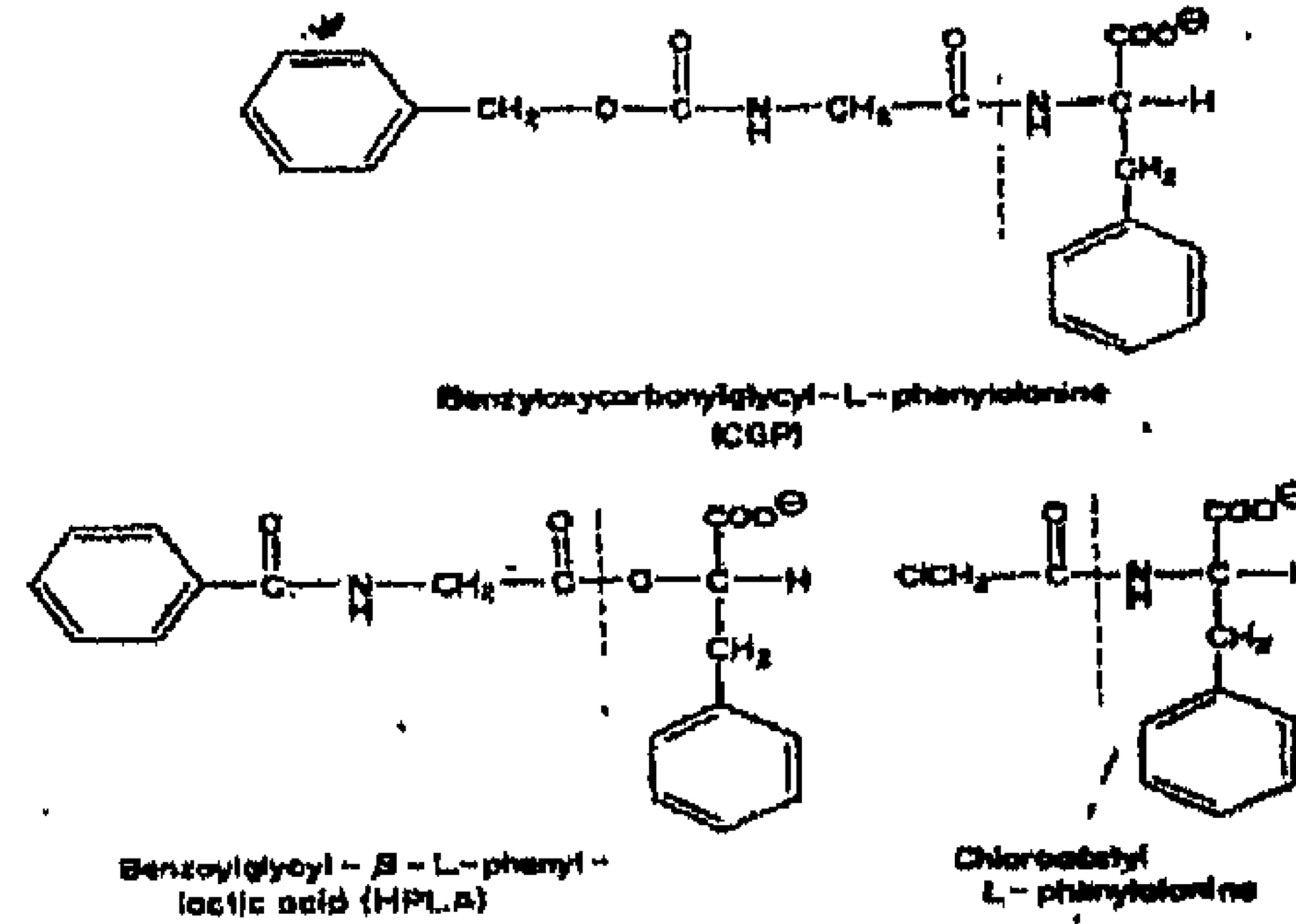
في حالة البروتيازات المعدنية. تكون الأيونات الفلزية عادة مسهمة في عملية التحفيز. إن هذه الأنزيمات ومن ضمنها الأنزيم المستخلص من البكتريا Clostridium والمسمى Clostridiopeptidase يمكن أن تثبط بالمركبات التي تكون معقدات فلزية وكمثال EDTA أن جميع البروتيازات التابعة لهذه المجموعة هي من نوع Exopeptidase وكمثال A-Peptidy1-L- amino acid Carbo hydrolase A Ypetidase و B Caroboxypeptidase (peptidyl-L- Lysine hydrolase) المستخلص من عضلات الفأر، و Carnosinase الذي يعمل على المركب B- Alanyl-L- histidine والمركبات ذات العلاقة Leucine aminopeptidase L- Leuly peptide hydrolase وجميعها تحتاج أيونات Zn^{2+} في عملها.

أما prolidase amino - acyl - L - proline hydrolase وهو عبارة عن Dipeptidase، فيحلل مائياً الببتيد الثنائي الذي يكون فيه البرولين أو الهدروكسي برولين في النهاية الكربوكسيلية. وأما الأنزيم Iminopeptidase فيحلل مائياً الببتيد الثنائي الذي يكون البرولين أو الهدروكسي برولين فيه في النهاية- N وكلا الأنزيمين يحتاج أيونات Mn^{2+} للتحفيز الأنزيمي.

يفرز سلف الكربوكسي ببتداز A البقرى Procarboxy peptidase A من البنكرياس عادة وله وزن جزيئي يقدر بـ 80000 ويتكون من ثلاث سلاسل لعديد الببتيد ويمكن تنشيطه إلى الكربوكسي ببتيداز A (وزنه الجزيئي 34500) بفعل أنزيم التربسين البنكرياسي الذي يؤثر في مولد أنزيمي آخر ويحوله إلى Carboxypeptidase B يعمل الأنزيمان بصورة عامة بآلية متشابهة وكلاهما يحتاج وجود مجموعة كاربوكسيلية حرة في الطرق C- للسلسلة ويحوي الأنزيمات أيونات Zn^{2+} في الموقع النشط ولكنهما يختلفان من حيث

تخصصهما للركيزة حيث أن Carboxy peptidase B يشترط أن تكون ثمالة الحامضي الأميني في الطرف- C ثمالة A rginine أو Lysine بينما تعمل Carboxy peptidase A على الببيتدات التي تكون ثمالات الحموض الأمينية في طرفها ArginineC أو Lysine أو proline.

يمكن استخدام ركيزتين لتقدير نشاط الأنزيم Carboxy peptidase A هما Bezlyoxy carbonylglycyl-L- phenylalanine (CGP) و Benzoyl – β- L- phenyllactic acid- (HPLA) وتركيبهما موضح أدناه:



يمكن إزالة Zn^{2+} من الكربوكسي ببتيداز بعامل مخلبي قوي جدا مثل – 1.15 phenanthroline. إن الأنزيم الخالي من المعدن لا يبدي أي نشاط أنزيمي ولكنه يحتفظ بقدرته على الإرتباط بالركيزة. ويمكن استبدال Zn^{2+} بأيونات معدنية ثنائية أخرى مثل CO^{2+}، Ni^{2+} pb^{2+} وإلى آخره. يكون الأنزيم في هذه الحالة نشطا إلا أن نسبة النشاط بوجود HPLA أو CGP غير ما هي عليه للأنزيم الفطري الحاوي Zn^{2+} هناك من المعلومات ما يفيد أن الكربوكسي ببيتداز A يحوي في الموقع النشط على ثمالة أو ثمالتي تيروسيل Tyrosyl وثمالة أميد ازول Imidazol. إن ما يؤكد وجود الإميدازول في الموقع النشط هو البيانات الحركية kinetic data التي توضح وجود مجموعة ذات PK تتراوح بين 6.5 و 7.65 تلعب دوراً في نشاط الأنزيم.

تحتوي سلسلة الأحماض الأمينية الكاملة لأنزيم كربوكسي ببيتداز A البقري على 300 أو 305 أو 307 ثمالة حامض أميني وتشكل بذلك الصيغ الأنزيمية Y أو B أو X على التوالي.

امكن تحديد التركيب الثالثي للأنزيم بحيود الأشعة السينية (شكل 2-60).

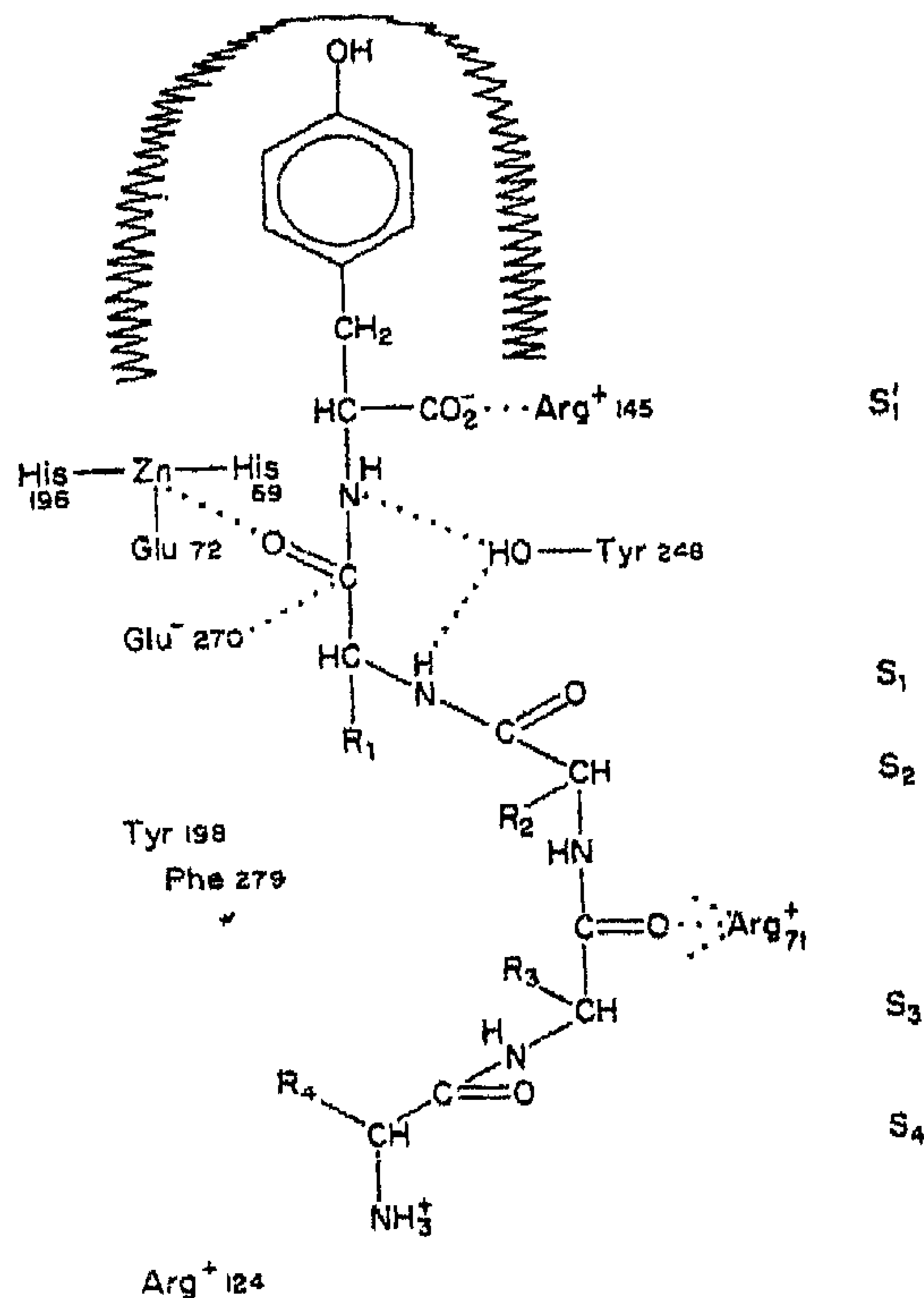


شكل (2- 60) التركيب الثانوي والثالثي للكربوكسي ببتيداز A في ضوء دراسات حيود الأشعة السينية. تثمل الدوائر الكربون – الفا لثمالات 307 حامض أميني. الموقع النشط محدد بدائرة في قلب الجزيئة.

تتكون الجزيئة الأنزيمية من سلسلة ببتيدية واحدة وتشكل ثمالتي الالنيل Ala والإسبارجنيل Asn النهايتين N وC على التوالي.

إن المنطقة المحيطة بالموقع النشط للأنزيم ليست اخدودا كما في حالة الأنزيم Papain ولكنها تبدو بمثابة حجرة (Hole) في الأنزيم ويفترض بأن المجموعة الجانبية R لثمالة الحمض في النهاية الكربوكسيلية للركزية تبرز في هذه الحجرة.

يوضح الشكل (2-61) صورة جانبية للحجرة الهدروفوبية للأنزيم



شكل (2- 61) ارتباط الركيزة في الموقع النشط للانزيم Carboxy Peptidase مجاميع NH و CO للآصرة الببتيدية المعرضة لفعل الانزيم، تقع في مستوى عمودي على الرسم.

يظهر في الشكل (2-61) ارتباط السلسلة الجانبية الهدروفوبية للحامض الأميني في الطرف C للركيزة. هناك عدة نقاط ارتباط أخرى بسطح الأنزيم ومنها الآصرة الكهرستاتية بين الشحنة السالبة للمجموعة الكربوكسيلية للركيزة والشحنة الموجبة للحامض الأميني ارجنين-145 Arg-145 للأنزيم وكذلك الأواصر الهدروجينية بين مجموعتي NH لآصرتين ببتيديتين في الأنزيم (أحدهما معرضة والأخرى غير معرضة للهجوم الأنزيمي) وتيروسين- Tyr-248248 للأنزيم. إضافة لذلك تنشأ اواصر ثنائية الاستقطاب بين Zn^{2+} وأوكسجين مجموعة الكربونيل للآصرة المعرضة لفعل

الأنزيم وبين Glu-270 للأنزيم وكربون مجموعة الكربونيل للآصرة ذاتها المعرضة للفعالية التحفيزية للأنزيم.

يكون أيون الزنك اصرة تناسقية مع His-196 وHis-69 .Glu-72 وتبعا لطبيعة وحجم الركيزة، يستطيع الزنك كذلك التآثر مع Ag-71، Tyr-198 و phe-279.

د. البروتيازات الحامضية Acid Proteases

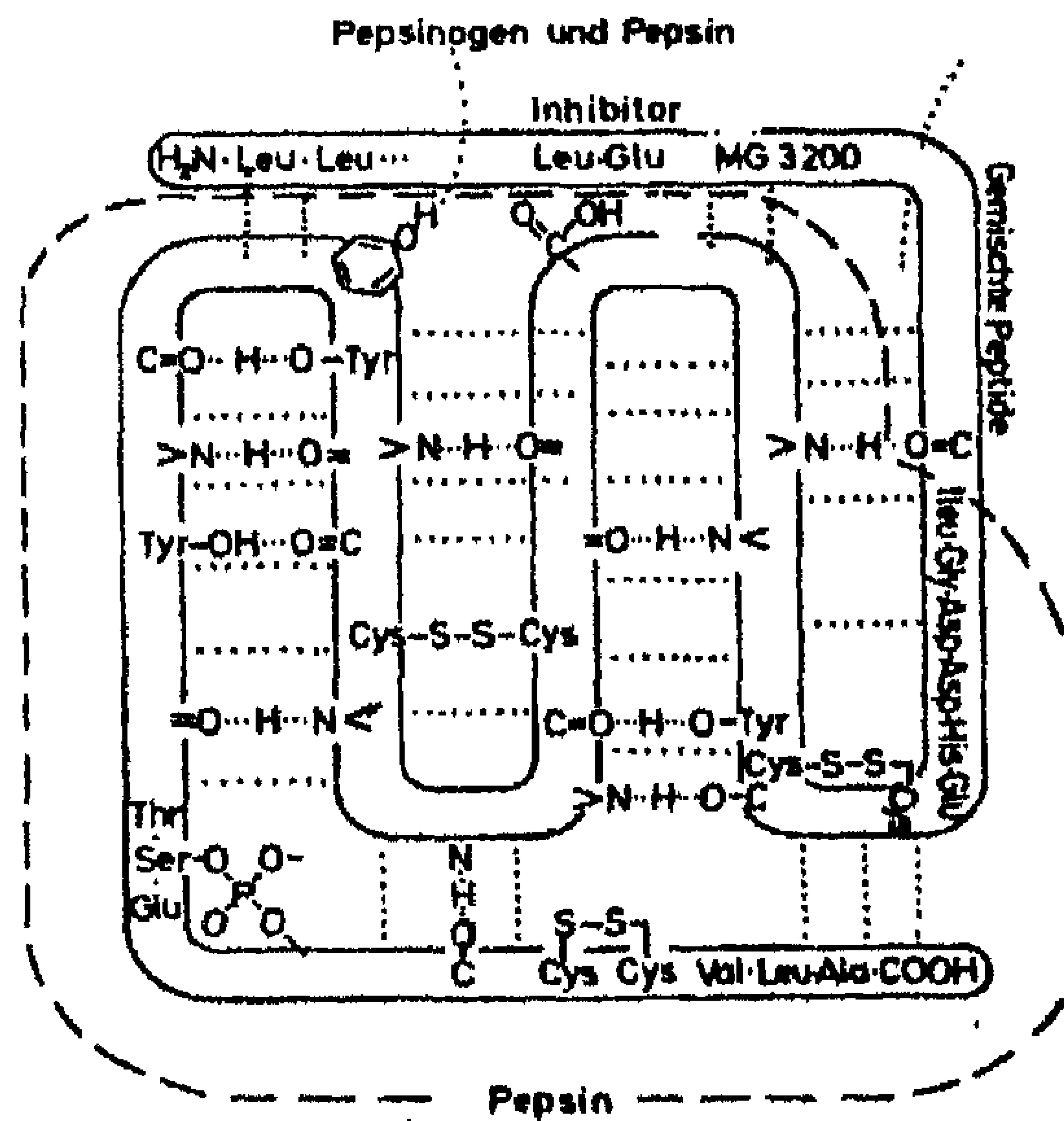
توضح التسمية بأن الرقم الهدروجيني الأمثل لأنزيمات هذه المجموعة يكون واطئا ولا تشير إلى المجاميع الفعالة في الموقع النشط. يتراوح الرقم الهدروديني الأمثل لهذه الأنزيمات بين (2) كما في الببسين و4 للأنزيمات الأخرى وتوضح سيماء فعالية الأنزيم في الأرقام الهدروجينية المختلفة PH-Activity Profile وجود مجموعة كربوكسيلية أو أكثر في الموقع النشط للأنزيم. لقد تمت أفضل الدراسات على أنزيم الببسين. ويعد أنزيم الرنين Rennin أكثر أنزيمات هذه المجموعة فائدة على النطاق التجاري لاستعمالاته الواسعة في صناعة الأجبان. ينتمي إلى هذه المجموعة من الأنزيمات، عدد كبير من البروتيازات الموجودة في الأحياء المجهرية إلا أن الدراسات عنها قليلة جدا.

هناك نوعان من أنزيمات البروتياز في الفطر و Endothia Parasitica Mucor Pusillus ويمكن أن يكونا بديلين جديدين للرنين.

يعد أنزيم الرنين الأنزيم الرئيسي للمعدة الرابعة للعجول الرضيعة ويفرز عادة بشكل مولد أنزيمي Zymogen ويسمى في هذه الحالة Prorennin وعندما يتقدم العجل في السن ويتبدل غذاؤه من الحليب إلى الحشائش والحبوب، تقل كمية الرنين المنتجة في المعدة وتزداد كمية الببسين.

الرقم الهدروجيني الأمثل لنشاط الرنين في البروتينات 3.5 ولكن عند تخثر الحليب يكون الرقم الهدروجيني للمحيط عادة 5.5-6.5. لم يدرس تخصص الرنين للركيزة بصورة تفصيلية إلا أنه يعتقد بكونه مشابها لأنزيم الببسين. ويكون الرنين مستقرا جدا في الرقم الهدروجيني 5.0 ولكن في الرقم 3.5 يبدأ بالتحلل ذاتيا Autolysis ويتمسخ في PH أعلى من 6 بصورة سريعة. الوزن الجزيئي للرنين (30000).

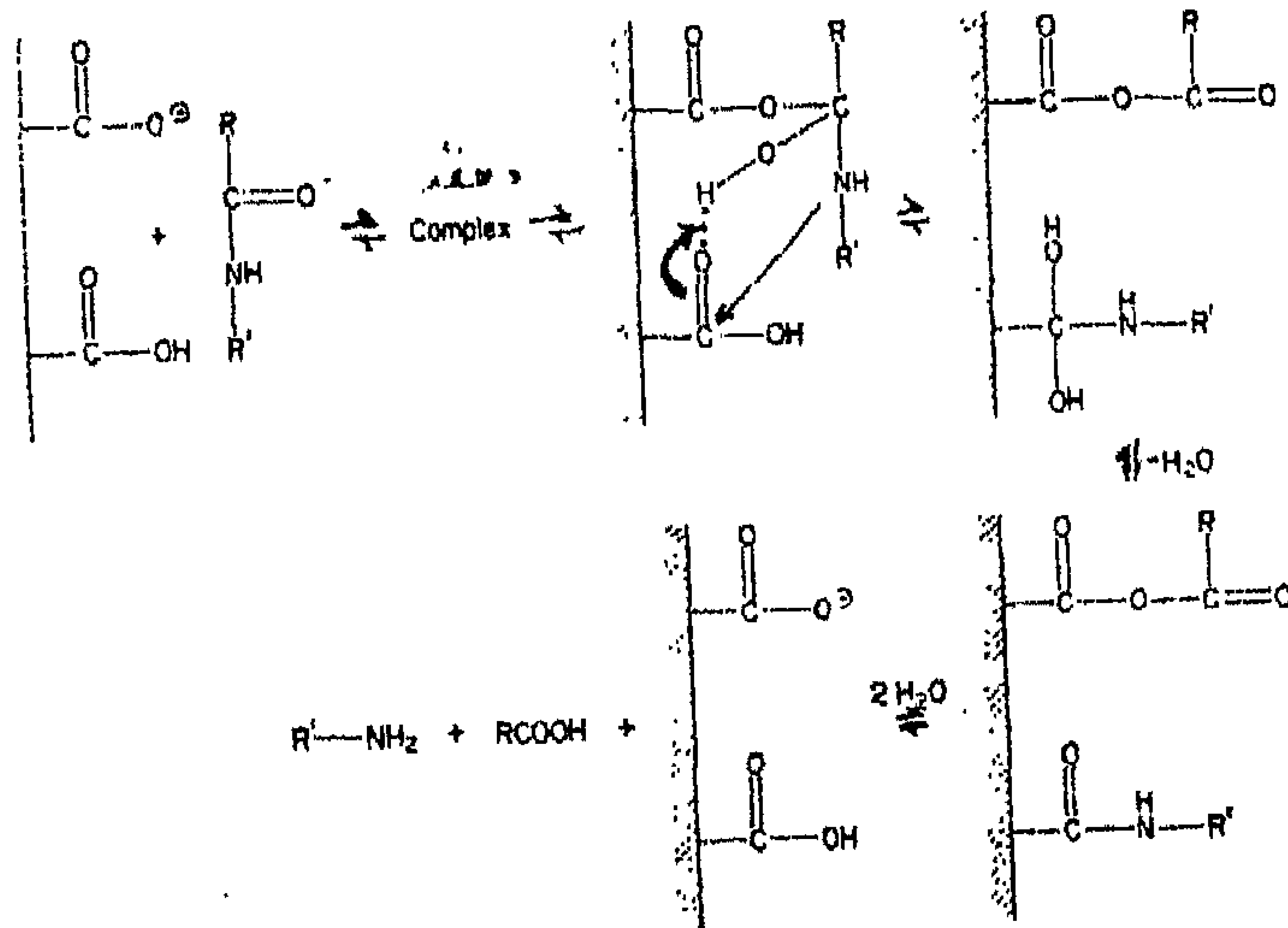
يفرز الببسنوجين (وزنه الجزيئي 42000) من الخلايا الرئيسة المخاطية للمعدة Chief cells of the mucosa ويتحول إلى Pepsin (وزنه الجزيئي 35000) بعملية ذاتية التحفيز بوجود تركيز عال لحامض HCL في المعدة (حوالي 0.01 مولار)، إذ تشطر عدة ببتيدات من المولد الأنزيمي (شكل 2-62).



شكل (2- 62) تحول الببسنوجين إلى ببسين.

تدل الدراسات الحركية على الركائز المحضرة مختبريا بأن سيماء الفعالية الأنزيمية في الأرقام الهدروجينية المختلفة PH- activity Profile يعتمد على قيم PK مقدارها حوالي 2 وحوالي 5 كما أن الأنزيم يثبط بمركبات الديازو Diazo التي تتفاعل مع مجاميع الكربوكسيل، ومن هذه الدراسات استدل على أن مجموعتي الكربوكسيل توجدان في الموقع النشط للأنزيم.

يوضح الشكل (2-63) الآلية المقترحة للفعالية التحفيزية لأنزيم الببسين. يتضح من الشكل بأن للأنزيم مجموعتي كربوكسيل أحداهما مبرتنة والأخرى بشكل أيويني وكلاهما في الموقع النشط. يتكون معقد أنزيم- ركيزة امتزازي Adsorptive ويتبع ذلك هجوم نيوكليوفيلي لمجموعة الكربوكسيل على مجموعة الكربونيل للأصرة الببتيدية. إن هذا يؤدي إلى تكوين مركب وسطي تساهمي.



شكل (2- 63) الآلية المقترحة للفعالية التحفيزية لانزيم الببسين.

يعمل الأوكسجين الكربونيلي للكربوكسيلات المبرتنة لإستخلاص البروتون من مجموعة الهدروكسيل مسهلا بذلك الهجوم الإلكتروفيلي للكربون

الكربونيلي على مجموعة NH للآصرة الببيتدية. وبالنتيجة يتكون مركب وسطي وهو امينواسيل- الأنزيم وهذا يتفاعل بدوره مع الماء لإعطاء نواتج التفاعل.

يمكن توضيح التخصص النسبي لكل من الببسين والرنين في الإنسولين المؤكسد بالشكل (2-64). يتضح من الشكل تماثل العديد من مواقع هجوم الببسين والرنين.

ومن الأهمية بمكان أن يذكر اجماليا وجود تفضيل بارز لتحلل بعض الأواصر من قبل أنزيم معين وهذه نتيجة حتمية لإختلاف المجاميع الفعالة في الموقع النشط للأنزيم كما مبين في الجدول (2-17).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

NH_2 H_2N SO_3H SO_3H

PheVc AsP Glu His Leu Cys Gly Ser His Leu Vol Glu Alc Leu Tye Leu Vol Cys gly Gllu Arg Gly Phe Phe Tye Thr Pro Lys Alo

↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑

P P P P P P P P P

R R R R R R R R

شكل 2-64 تخصص الببسين (P) والرنين (R) للتحلل المائي للأواصر الببتيدية في الإنسولين المؤكسد. تمثل الحروف الكبيرة الحلمهة (التحلل المائي) السريعة والحروف الصغيرة الحلمهة البطيئة.

جدول 2-17 بعض خصائص البروتيازات

اسم الأنزيم	المركز النشط	مصدر الأنزيم	PH المثالي	التخصص
Trypsin	Se..His	الأمعاء الدقيقة	7.5-8.5	Ag, lys
Papain	SH	اثمار البابايا	5	Arg Lys , leu Giy
Pepsin	COOH	المعدة الرابعة	1.3-3	Tyr Phe k-Casein

اسم الأنزيم	المركز النشط	مصدر الأنزيم	PH المثالي	التخصص
Rennin	COOH	للعجول		
Thermolysin	Zn2+	البكتريا	6–10	Leu, phe

Amino acid↓: يعني كسر الرابطة في النهاية الكربوكسيلية

↓Amino acid: يعني كسر الرابطة في النهاية الأمينية

↓Amino acid↓: يعني كسر الرابطة في النهاية الكربوكسيلية

2-8-7-3 قياس فعالية البروتيازات

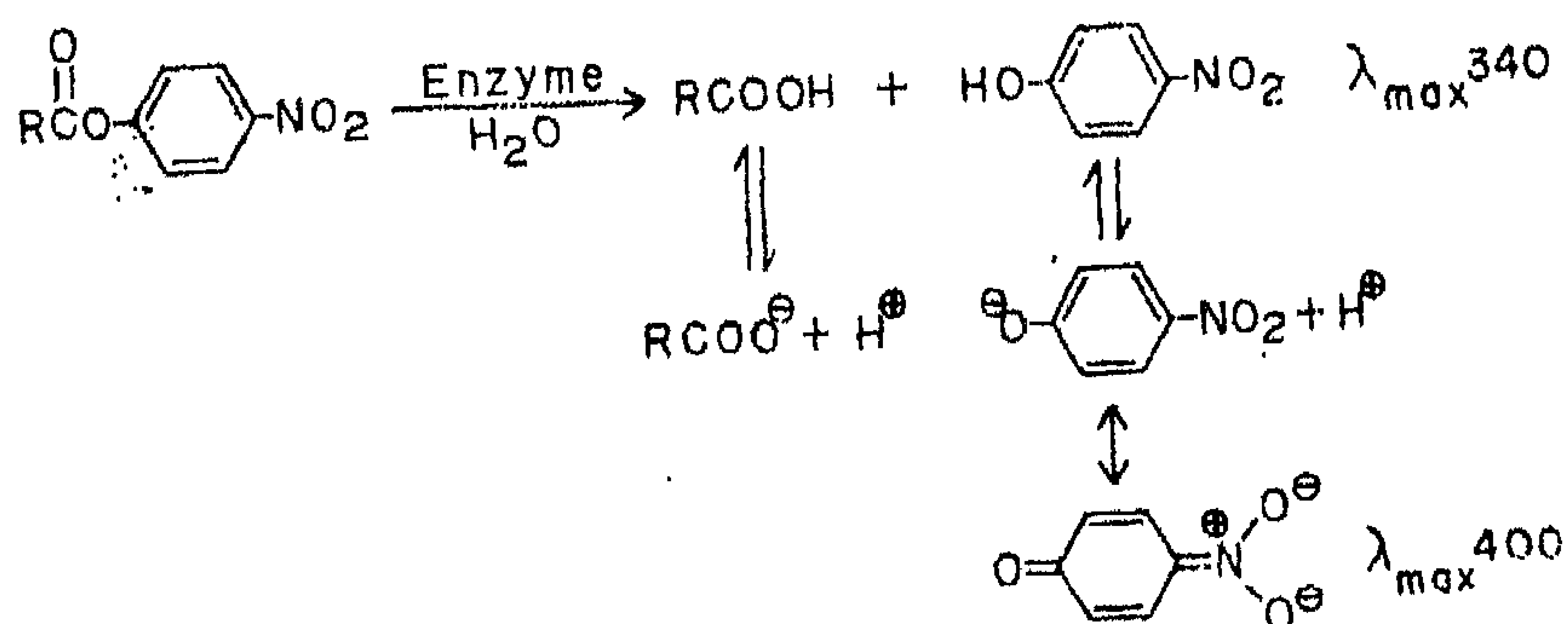
هناك عدة طرق لقياس الفعالية الأنزيمية ويستخدم لهذا الغرض ركائز محضرة مختبرياً أو تروتينات طبيعية.

أ. استخدام البروتينات بوصفها ركائز للبروتيازات

من الطرق واسعة الإنتشار، تغير قابلية وذوبان البروتين في ثلاثي كلور حامض الخليك Trichloroacetic acid(TCA) بعد تعرضه لفعل البروتياز. ومن البروتينات المستعملة لهذا الغرض: الكازين Casein والهيموكلوبين المتمسخ Denatured بالحامض أو باليوريا. فعندما يعمل الأنزيم على البروتين، تتناسب كمية الببتيد الذائب في TCA طردياً مع كمية الأنزيم وزمن الحضن معه ويمكن تقدير كمية الناتج بقياس امتصاصية الرائق عند الطول الموجي 280 نانوميتر أو باستعمال تفاعلات لونية للتيروسين أو للأواصر الببتيدية للببتيدات الذائبة يمكن تقدير عدد الأواصر الببتيدية باستعمال كاشف ننهدرين Ninhydin الذي يتفاعل كمياً مع المجاميع الأمينية الحرة ليعطي لوناً ارجوانياً ذوامتصاصية قصوى في 570 نانوميتر.

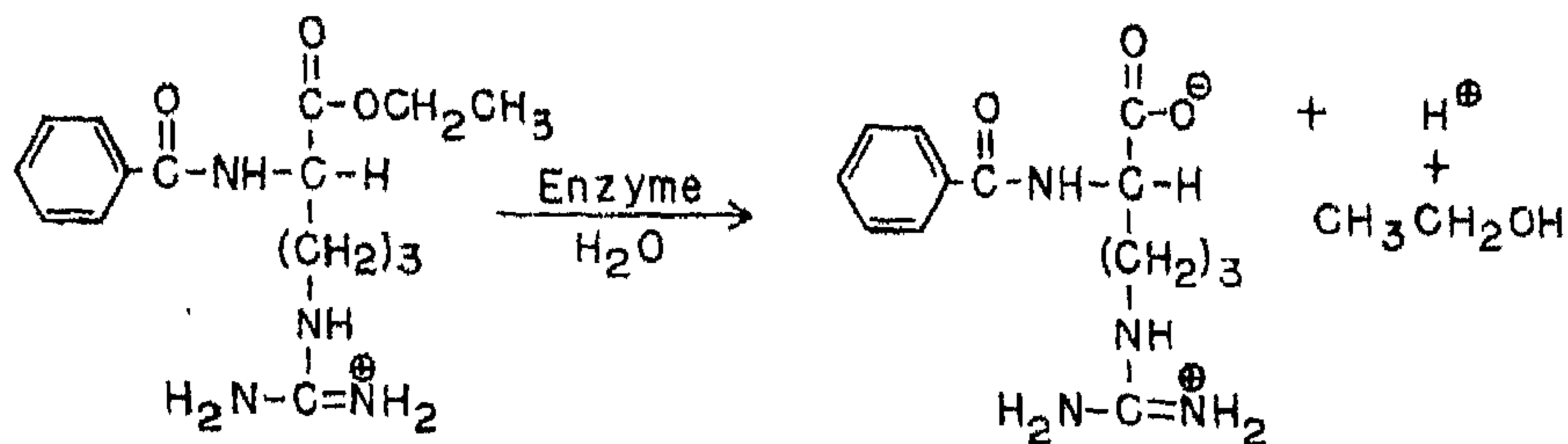
ب. استعمال ركائز محضرة مختبرياً

إن أكثر الركائز الصناعية لقياس هذه الأنزيمات، تحتوي على أواصر استر أو أميد أو اواصر ببتيدية، وكمثال يمكن متابعة تحلل استر النتروفينول – Nitrophenol ester وهي ركيز مولدة للصبغة chromogenic عند طول موجي 400 نانوميتر (في PH أعلى من 7) أو عند طول موجي 340 نانوميتر (في PH أقل من 7) كما في المعادلة 2-73:



(73 -2 ...)

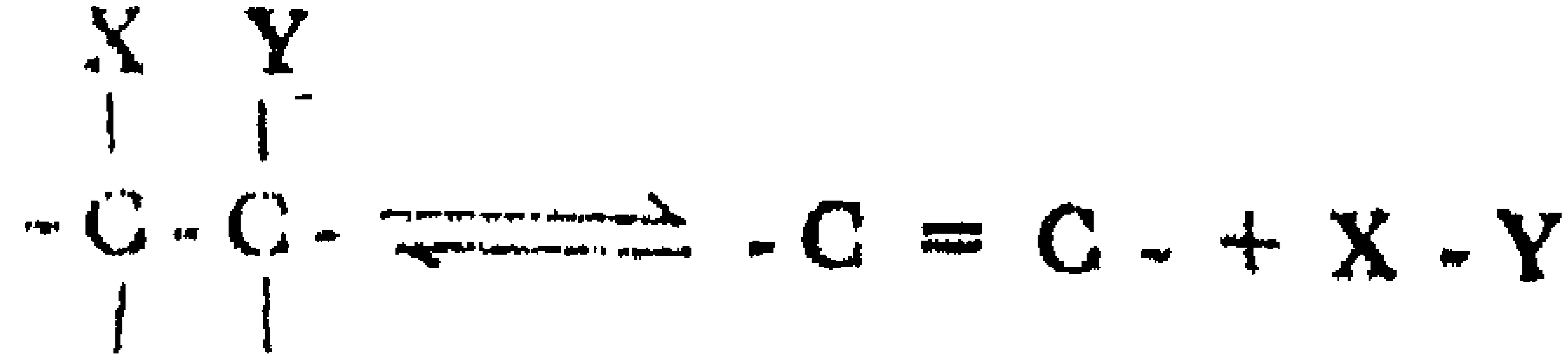
وكثيراً ما يمكن متابعة التحلل المائي للاسترات والإميدات بالطرق الطيفية فمثلاً يتضح التحلل المائي للمركب α- N-Benzoyl-L- arginine- ethyl ester بزيادة الإمتصاصية عند 253نانوميتر لتكون مجموعة الكربوكسيلات كما في المعادلة (2-74)... (2-74)



(74 -2) ...

2-9 أنزيمات الفصل والإضافة Lyases

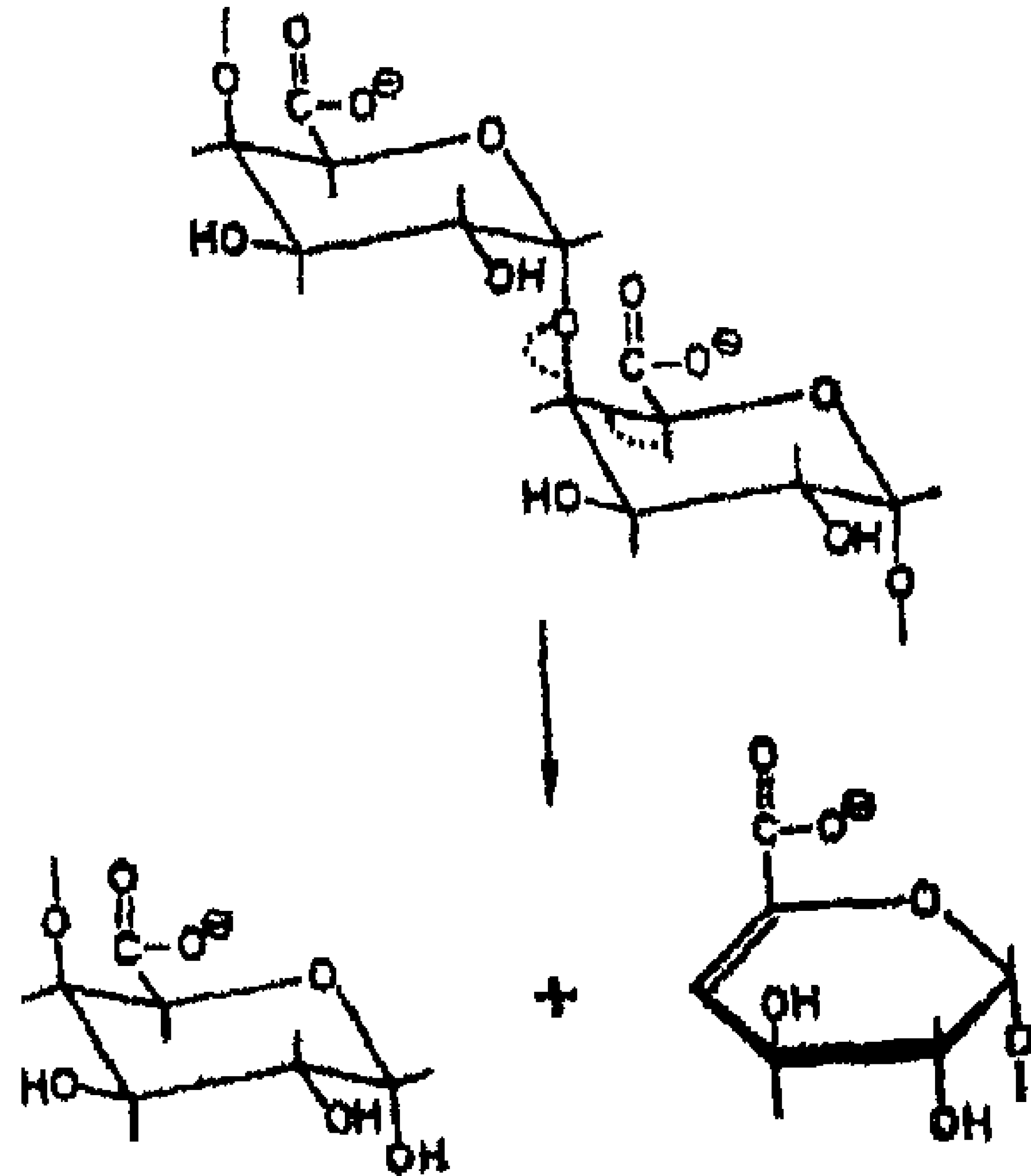
وتشمل الأنزيمات النازعة لمجاميع من الركائز بآلية غير التحلل المائي مسببة تكوين آصرة مزدوجة



(75 -2) ...

ويمكن أن تضيف هذه الأنزيمات مجاميع إلى الأواصر المزدوجة (التفاعل الخلفي) تمثل هذه الأنزيمات الصنف الرابع تبعاً للتسمية النظامية ويضم هذا الأنزيم الصنف الأنزيمات التي تعمل على الأواصر C-C و N-C و S-C و O-C

ومن هذه الأنزيمات الأنزيم pectate lyase (1.4- D- Galacturonide lyase) الذي يعمل على كسر الآصرة الكلايكوسيدية O-C ويزيل 4.5- turonic acid A- D- Galac- من البكتين ولكن ليس عن طريق التحلل المائي كما في المعادلة الآتية



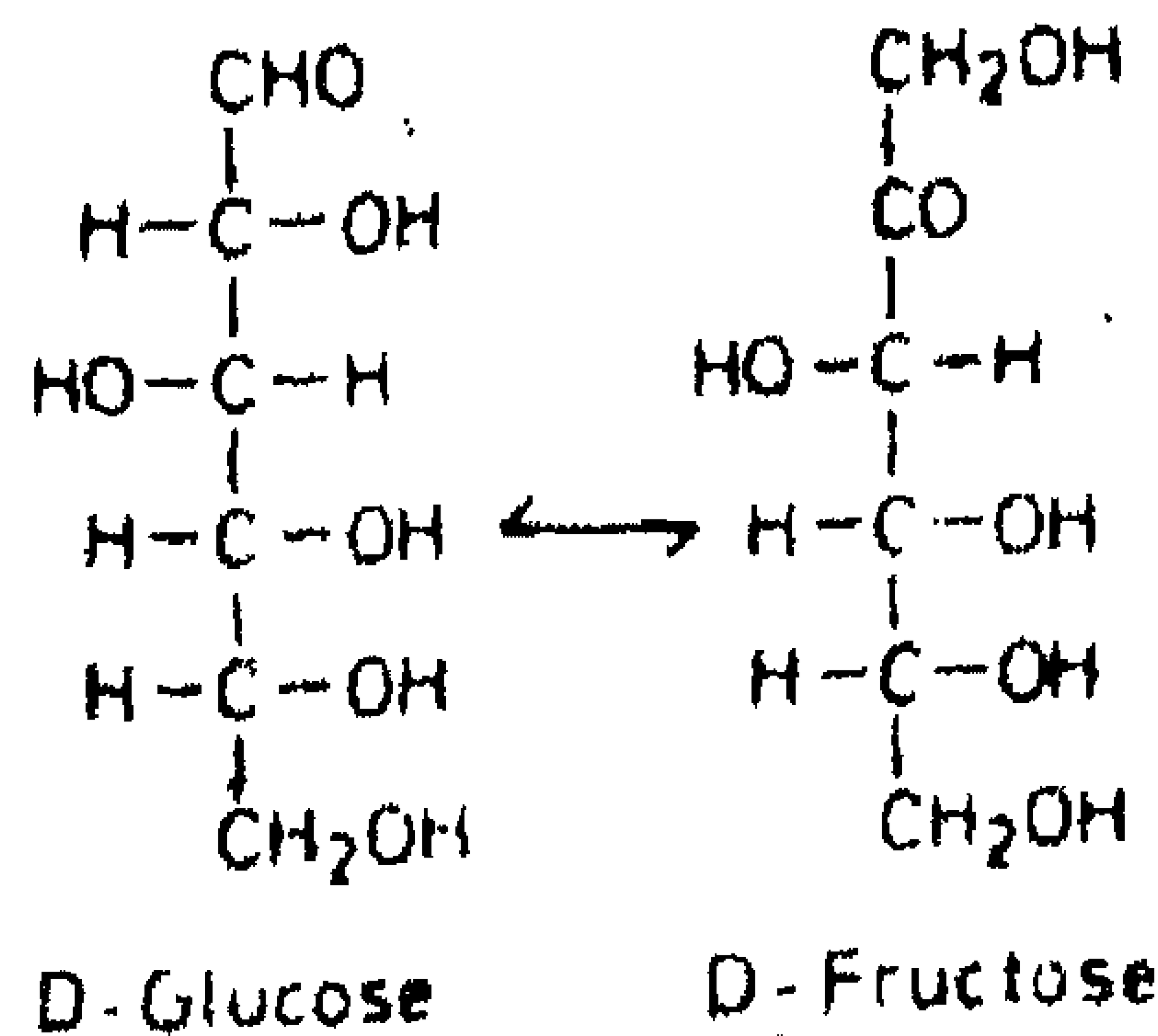
(76 -2) ...

يوجد هذا الانزيم في القطر ASP - foncecaeus.

10-2 الايزومرازات Isomerases

تمثل هذه الأنزيمات الصنف الخامس للأنزيمات وتحفز تحول مركب إلى زميرة Isomer وكمثال الأنزيمات المعروفة بالأسماء الشائعة : racemazes و epimerases و isomerases Trans - Cis من هذه المجموعة الأنزيم Glucose— isomerase (D - Glucose - Ketoisomerase)

ويحفز التفاعل المعكوس الآتي:



(77 -2) ...

ويحفز تحول الزايلوز Xylose إلى زايليلولوز Xylulose (km للكلوكوز=0.16 مولار وللزايلوز=0.32 مولار). ويعد الزايلوز عاملا محثاً inducing agent لإنتاج الأنزيم بواسطة Stretomyces albus

يلعب الأنزيم isomerase Glucose دوراً في صناعات الشراب Syrup والعصير إذ نتيجة لتحويل الكلوكوز إلى فركتوز بفعل هذا الأنزيم، تزداد حلاوة الشراب. ويمكن تحضير هذا الأنزيم من أنواع مختارة من الكائنات

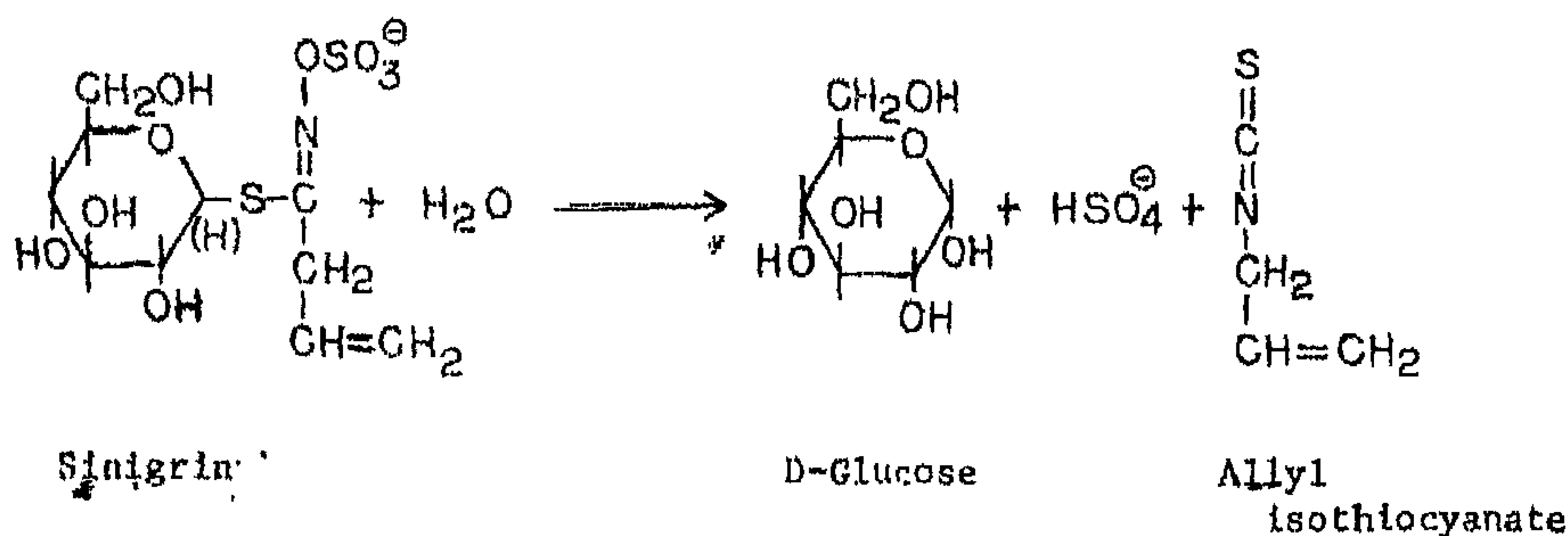
المجهرية مثل Sterptomyces.albus الأنزيم isomerase Glucose يعد Endoenzyme وهو مستقر في الرقم الهدروجيني 4-12.

الدرجة الحرارية المثلى للأنزيم 80°م. وعند درجة الحرارة 25°م، يتكون عند الموازنة (معادلة 2-76) 57.5٪ كلوكوز و 42.5٪ فركتوز. أما في درجة 70°م فيشكل الكلوكوز 43.5٪ فركتوز. أما في درجة 70°م فيشكل الكلوكوز 43.5٪ والفركتوز 56.5٪.

2-11 الأنزيمات المولدة لمركبات النكهة Flavor

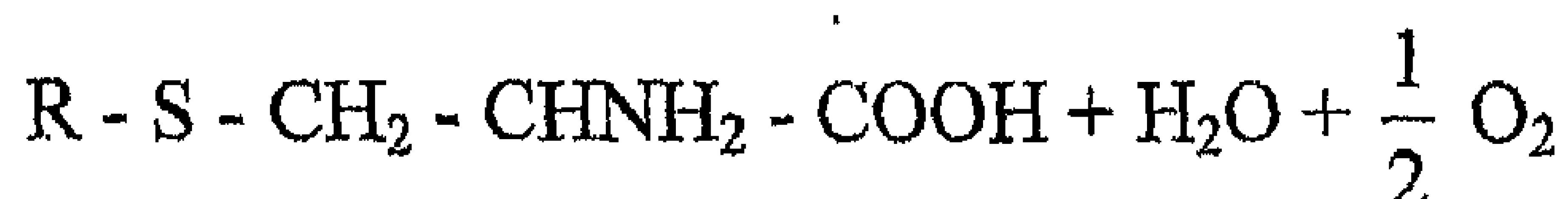
تتكون مركبات النكهة نتيجة لفعل أنزيم منفرد على سلف Precursor مركب النكهة. ويقصد بالنكهة صفتان رئيسيتان وهم الطعم والرائحة ويعني الإحساس المنبعث عن الفم والمركبات التي تعطي الرائحة هي متطايرة.

في النباتات مثلا مثل الكرنب والفجل والخردل. يكون المركب المسؤول عن النكهة هو زيت الخردل Allyl isothiocyanate Mustardoil وكما يظهر من المعادلة، ينتج هذا المركب عن فعل الأنزيم Thioglycosidase في المركبات Thioglycosides مثل Sinigrin

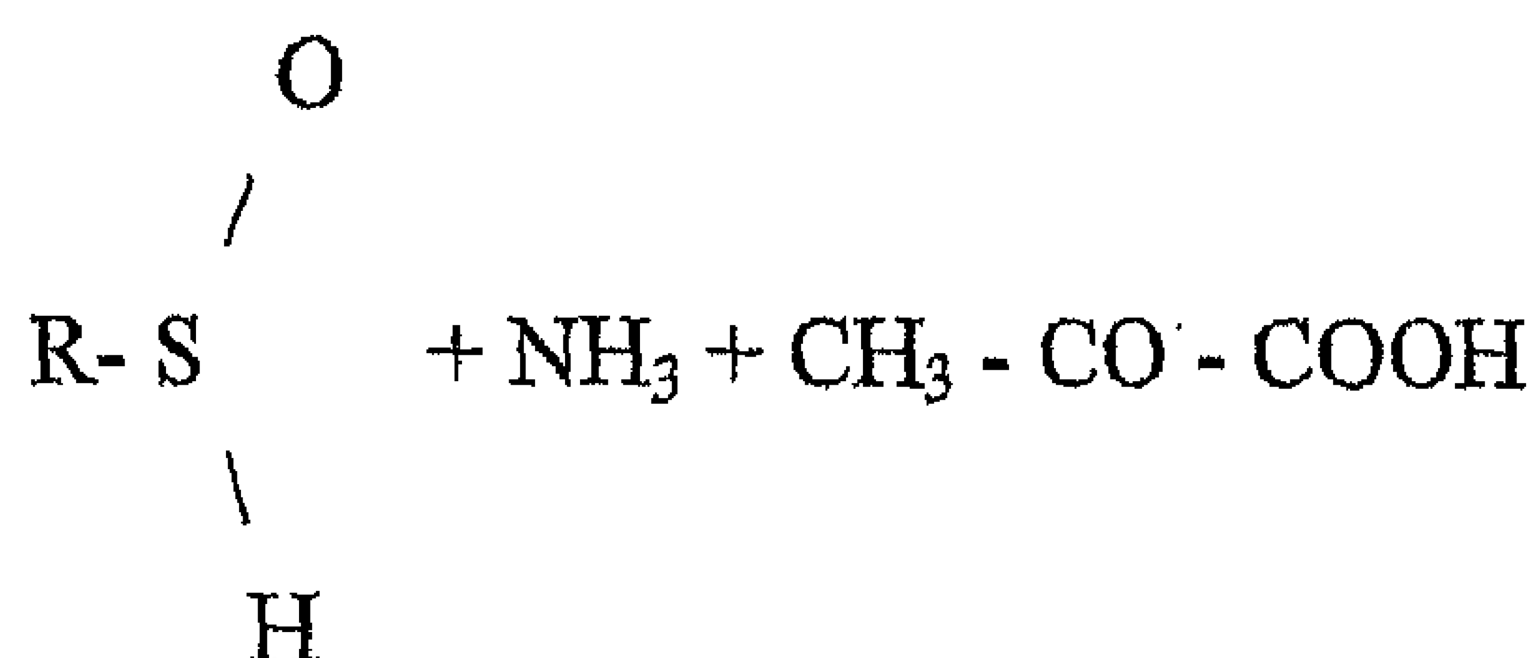


(78 -2) ...

و Sinalbin ويسمى الأنـزيم Thioglycosidase بالإسـم الشائع Singigrinase إن نكهة البصل ناتجة عن فعل الأنـزيم Endogenous S – L-Cystein Sulfoxide lyase في المركب alkyl ay - L- cysteine Sulfoxide وكما يأتي:



$$R - S - CH_2 - CHNH_2 - COOH + H_2O + \frac{1}{2} O_2$$



$$R\text{-}S(=O)(H) + NH_3 + CH_3 - CO - COOH$$

(79 -2) ....

إن المركب المتطير الناتج الحاوي على الكبريت مسؤول عن نكهة البصل.

12-2 المصادر

1. Farrer, K.T.H. The Thermal Destruction of Vitamin B_1 in foods. Adv.

Food Res. 6.275.1955.

2. Ponting J.D. The control of Enzymatic Browning of Fruits In Food Enzymes Avil Publ. Co. Westport, Connecticut, 1960

3. Heimann W. and Heimann, A. Mechanisms der Wissnschaft. Linches

Veroffetnlichungen der deustchen Gesellschaft fur Ernahrung, Ascorbinsaure Bd 14.1964.

4.Mapson. L.W. Enzymic Browning of prepeeled potato tissue Nitrition (London) 19, 123.

5. Plank, R. Handbuch der kaeltetechink. Ed. Xiv. Springer. Verlage: Berlin, 1966.

6. Klotz. J.M Comparison of molecular structures of proteins: Helix Content. Distribution of Apolar Residues, Arch. Biochem, Bio-phys. 138, 74,1971.

7. Gray. C.J. Enzyme-Catalysed Reaction. Van Nostrand Reinhold Comp. London 1971.

8. Eskin, N.A.M. Henderson H.M. Townsed. R.J Biochemistry of Foods, 1971.

9. Whitaker. J.R. Principles of Enzymology for the Food sciences. Dekker. Inc. New York, 1972.

10. Karlson P. Blochemie. Georg thieme Velag stgt. 1972.

11. Shaltiel, S.U.Z Er- el Proc. Not. Acad. Sci (U.S.A) 70.778.1973.

12. Hofstee, B.H.j. Hydrophobic Affinity chromatography of Proteins. Anal. Biochem. 52. 420.1973.

13. Hjerten. S. Some General Aspects of Hydrophobic Interaction chromatography. J. chrom. 87. 325. 1973.

14. Porath j. Sundberg. L.U. I Olsson. Salting out in Amphiphilic Gels as a New Approach to Hydrophobic Adsorption, Nature 245.465.1973.

15.Brockerhoff. H.Lipolytic Enzymes. In Food Related Enzymes (Ed. Whitaker.J.R.) p.131, Advances in chemistry Series 136 American chemical Society: Wasington, D.C. 1974.

16. Bergner, K.-G and Sabir D.M.Z. lebensum Unters-Forsch.165.85. 1977.

17. Veldink. G.A. Vliegenthart. J.F.G. Boldingh. J. Plant Lipoxygen-ases. Prog. Chem. Fats and other lipids 15,131, 1977.

18. Lehninger. A.L. Biochemie.Verlag chemie, weinheim. 1977.

19. Klaeui H. Anwerdung der Vit C und E als Antioxidantein in der Lebensmitteltechn. In: Natureliche and Synthetische Zusatstoffe in

der Nahrung des Menschen, C.I.I.A. Symposia. S. 62-84, Steinkopf, Darwstadt.1974.

20. Bruchmann,E.E. Angewandte Biochemie Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 1979.

21. Heimann, W. Fundamentals of Food Chemistry. Ellis Hodwood Publishers, 1980.

22. Seib.p.A. & Tolbert B.M.Ascorbic Acid chemistry. Mtabolism and Uses, Avances in chemistry· Series 200. American chemical Society. Washington,D.C. 1982.

23. Cunningham. E.B. Biochemistry Mechanism of Metabolism, McGraw-Hill Book Company 1978.

24. Counsell j.N. Horing, D.H. Vitamin C (Ascorbic Acid)Applied science Publ. London. New Jersey. 1981.

25. Gierschner,K.Zur Chemie and Technologie der pectinstoffe (teil 1).Intern.Zeitschrift fur Lebensmittechnologie and Verfarentech-nick.200.34.1983.

26. I B D.Teil 2. 624.34.1983.

27.Sabir,D.M. Zur Kenntnis Von Manna Z.Von Lebensm. Rund 1445,1984.

28. Belitz H.D. & Grosch W. Lehrbuch der Lebensmittelechemic Zweite Auflaga, Springer Velag,1985.

29. Stryer.L.Biochemistry.3rd den. Freeman &Co.New York.1988.

الفصل الثالث

الاختمار Fermentation

الفصل الثالث

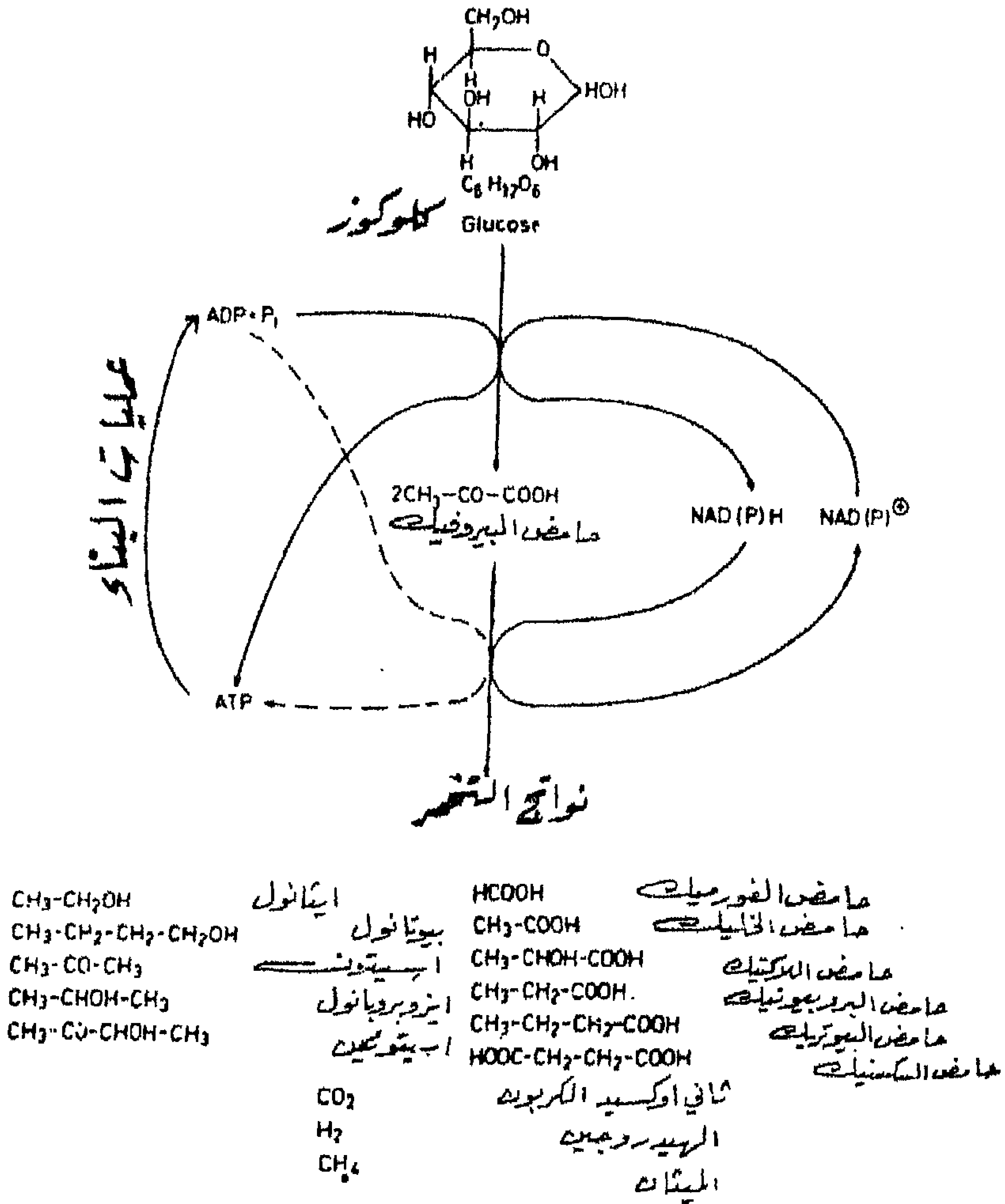
الإختمار Fermentation

3-1 الإختمار اللاهوائي Anaerobic Fermentation

الاختمار اللاهوائي عمليات كيميائية حياتية منتجة للطاقة تسحب من خلالها ذرات الهيدروجين أو الإلكترونات (أي ما يسمى مكافئات الإختزال) من مركبات عضوية تمثل على الأغلب نواتج تحلل الكربوهيدرات وتنقل إلى مركبات مستلمة وهي التميمات الأنزيمية Coenzymes أو المجاميع الضميمة Prosthetic groups وبذلك يعمل المركب العضوي بمثابة واهب لمكافئات الإختزال Donor فيما يمثل الأنزيم أو المجموعة الضميمة المركب المتقبل لها Acceptor

يكون المركب عالي الطاقة ATP في الإختمار اللاهوائي بطريقة الفسفرة على مستوى الركيزة Substarte- level phosphorylation حيث تنتقل مجموعة الفسفات من المركبات الوسطية المفسفرة إلى المركب ADP. ويمكن توضيح مجمل عمليات الإختمار اللاهوائي بصورة عامة بالشكل (3-1):

يتضح من الشكل بأن سكر الكلوكوز يتحول في عمليات الإختمار إلى ناتج رئيسي مركزي وهو حامض البيروفك Pyruvic وتتكون نواتج التخمر المختلفة من هذا الحامض فيما بعد اعماداً على الأنواع وتوافر أو عدم توافر الأوكسجين. يمثل تحول السكر إلى حامض البيروفك عملية أكسدة يتم من خلالها سحب ذرات الهدروجين وربطها بتميمات أنزيمية متخصصة $NADP^+$، NAD^+ وبذلك يتم اختزالها. تستعمل التميمات الأنزيمية المختزلة فيما بعد لإختزال حامض البيروفك نفسه أو نواتج تحلله لتكوين نواتج الإختمار النهائية فمثلا يختزل حامض البيروفك إلى لاكتك Lactic بوصفه ناتجا نهائيا.



شكل (3-1) مخطط عام للاختمار اللاهوائي.

وفي بعض عمليات الإختمار، تستخدم ذرات الهدروجين المسحوبة من المركبات العضوية لإختزال مركبات غير عضوية. ينتمي إلى هذا النوع من الإختمار أو "التنفس اللاهوائي" اختزال النترات إلى أمونيا NH_4^+ أو نتروجين N_2 أما الكبريتات فتختزل إلى كبريتيد الهدروجين H_2S

يتضح مما تقدم بأن النترات أو الكبريتات استخدمت في التنفس اللاهوائي كمتقبلات (مستلمات) نهائية للاكترونات.

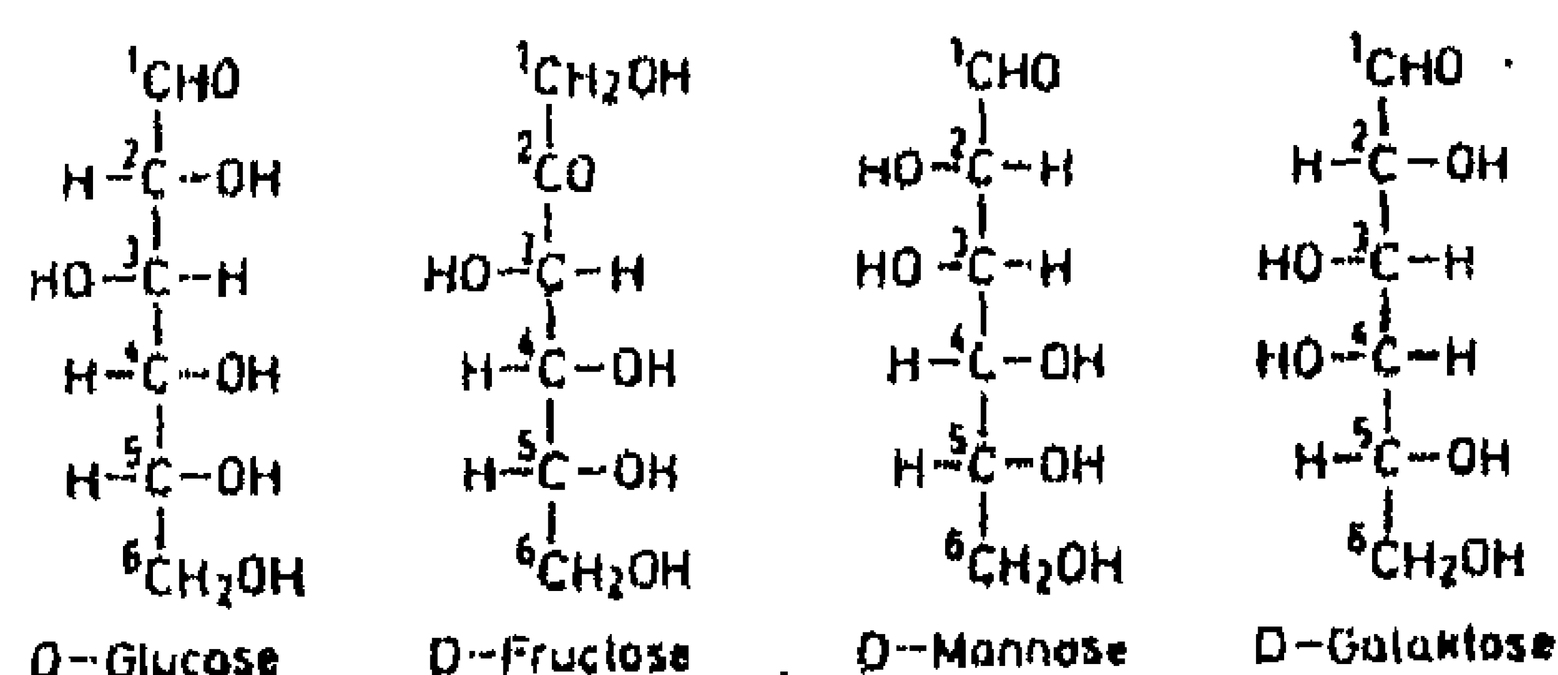
3-1-1 : بعض الاختمارات اللاهوائية المتخصصة

Specific anaerobic fermentations

3-1-1-1 : الاختمار الكحولي :

الاختمار الكحولي عملية كيميائية حياتية عرفت منذ زمن بعيد وكتبت المعادلة الإجمالية لها عام 1851 من قبل الباحث Gay-Lussac. يحصل هذا النوع من الاختمار في الخميرة Saccharomyces cerevisiae ولقد امكن التوصل إلى معرفة المركبات الوسطية للعملية والأنزيمات المحفزة لتحولاتها بعد مائة سنة تقريبا.

تختمر السكريات الأحادية كلوكوز ومانوز ذات الشاكلة "دي" D-sugar بفعل مجموعة أنزيمات الخميرة التي سميت سابقا Zymase، كما سميت هذه السكريات Zymohexoses. يختمر كل من السكرين وكلوكوز وفركتوز بالسرعة نفسها فيما يختمر المانوز بسرعة ابطأ. وعند مقارنة تراكيب هذه السكريات (شكل 3-2)، نجد تطابقا في توزيع مجاميع الهدروكسيل عند ذرات الكربون 3 و4و5 وهذا ضروري ومفروض للتحول الأنزيمي لجزيئة سكر سداسي الكربون إلى جزيئتي سكر ثلاثية الكربون.

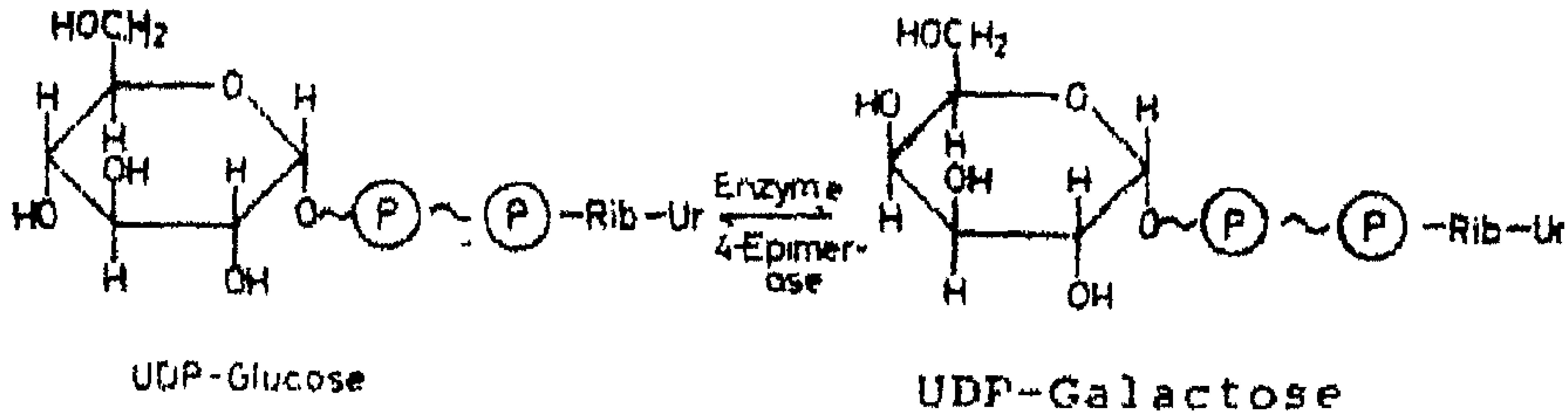


دي-كالاكتوز دي-مانوز دي-فركتوز دي-كلوكوز

شكل (3 – 2) تركيب بعض أحاديات السكريد سداسية الكربون.

يختمر سكر الكالاكتوز بسرعة من قبل عدد من الأحياء المجهرية (خمائر سكر الحليب) إذ تمتلك هذه الخمائر الأنزيم Epimerase-4 المحفز لتفاعلات المزامرة Isomerization بين diphosphate-glucose و Uridine

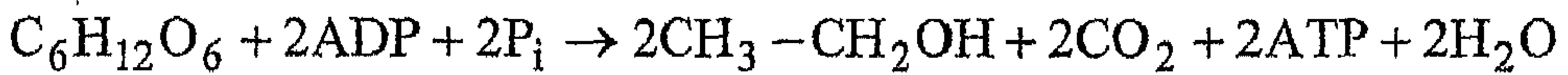
Uridine diphosphate-galactose كما في المعادلة الآتية:



(1-3)...

وهكذا يتحول الكالكتوز إلى الكلوكوز القابل للإختمار وتعد هذه الخطوة أساسية لإمكانيةاستخدام الكالاكتوز من قبل الأحياء المجهرية وبدونها يكون الكالاكتوز غير قابل للإختمار.

إن النواتج الرئيسة في الاختمار الكحولي هي الايثانول وثاني أكسيد الكربون ويمكن تمثيل المعادلة المثالية للإختمار الكحولي في الخميرة في الرقم الهيدروجيني 4-5 كما يأتي:



$$C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2P_i \rightarrow 2CH_3-CH_2OH + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O$$

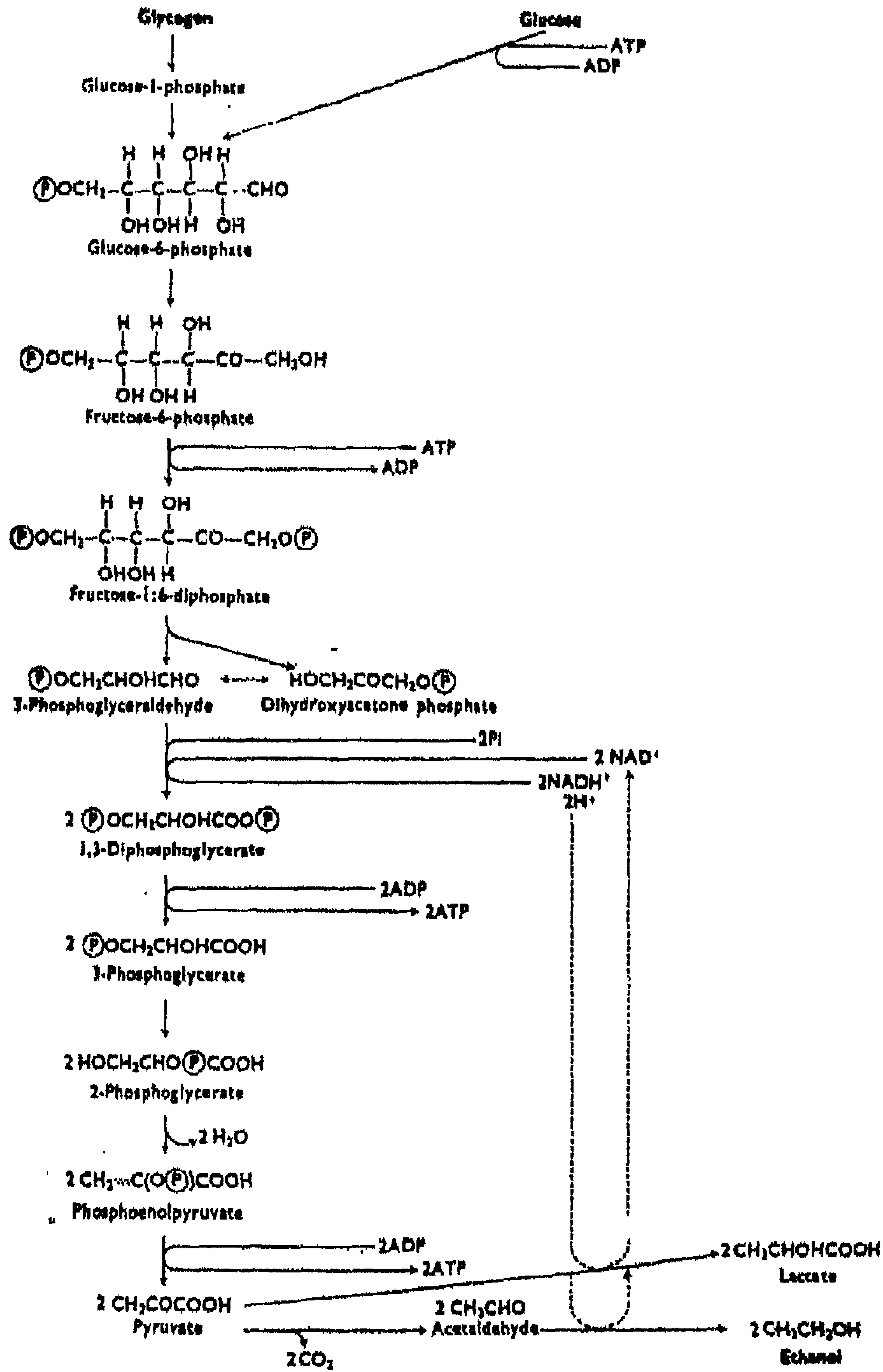
إضافة إلى النواتج الرئيسة، ينتج في الإختمار الكحولي نواتج ثانوية اخرى مثل الكلسيرول وحامض الخليك وحامض السكسنك وتزداد نسبة تكوين الكلسيرول وحامض الخليك عند زيادة الرقم الهيدروجيني لمحلول الركيزة كما يتضح من الجدول (3-1).

جدول 3-1: تغير تركيزات النواتج في عملية الاختمار الكحولي، التي تحصل في الخميرة Saccharomyces Cerevisiae مع تغير الرقم الهدروجيني لمحلول الركيزة (كلوكوز).

PH التركيز (ملي مولار) لكل 100 ملي مولار كلوكوز قيد التخمر	الرقم الهيدروجيني				
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
إيثانول	171.5	177.0	172.6	160.5	149.5
CO_2	180.8	189.8	187.6	177.0	161.0
كلسيرول	6.16	6.60	7.82	16.2	22.2
حامض الخليك	0.52	0.69	0.84	4.03	8.60
إسيتيل مثيل كاربينول acetion	–	–	–	–	0.07
حامض السكسنك	0.53	0.26	0.32	0.49	0.23
2،3- بيوتان دايول	0.75	0.48	0.46	0.53	0.45
حامض البيوتراك	0.13	0.32	0.25	0.36	0.25
حامض الفورمك	0.36	0.42	0.63	0.87	35.
حامض اللاكتك	0.82	0.38	0.47	1.63	1.93
زمن الاختمار (بالساعات)	29	14.5	17.5	15.5	35
النسبة المئوية للكلوكوز المختمر	98.0	97.0	96.5	98.0	98.3
النسبة -للكاربون للكلي المقدر في نهاية التجربة	93.8	98.0	96.3	96.4	92.5

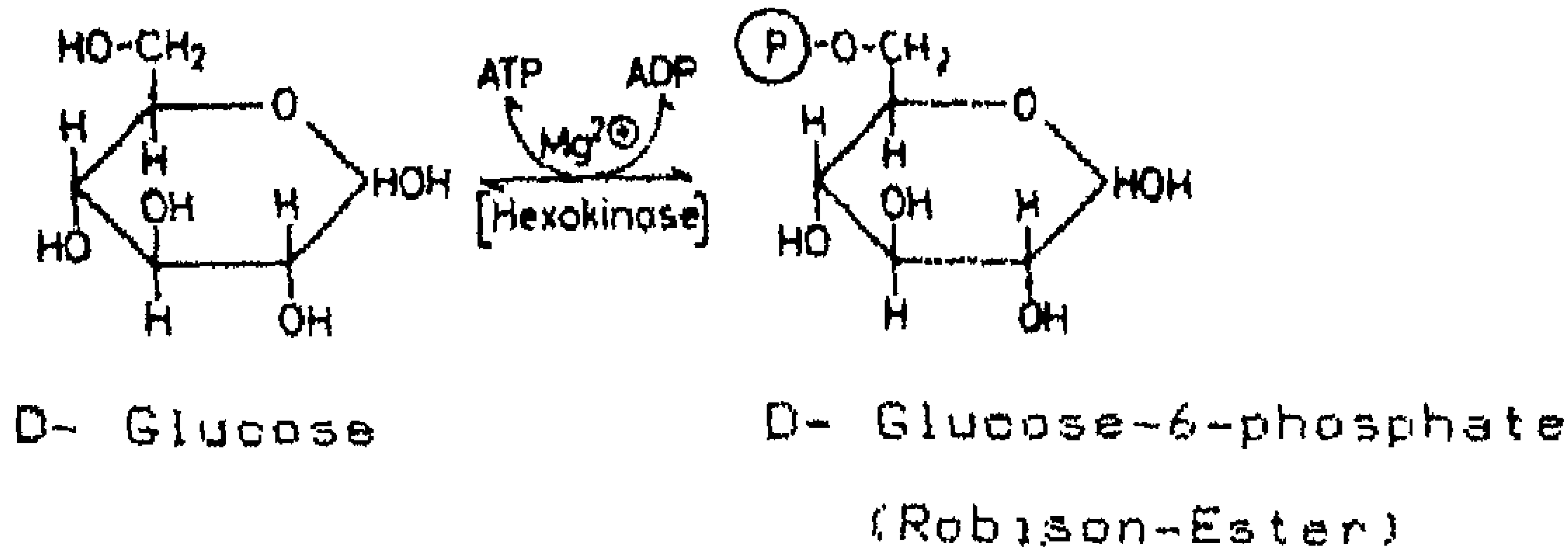
أما خطوات الإختمار الكحولي للكلوكوز والمركبات الوسطية المتكونة يمكن توضيحها بمسلك إمدن-مايرهوف- بارناس Embden-Mycrhof-Parnas pathyay(شكل 3-3).

وفيما يلي توضيح لخطوات المسلك:



شكل (3-3) مسلك إمدن- مايرهوف- بارناس- لتحلل السكر.

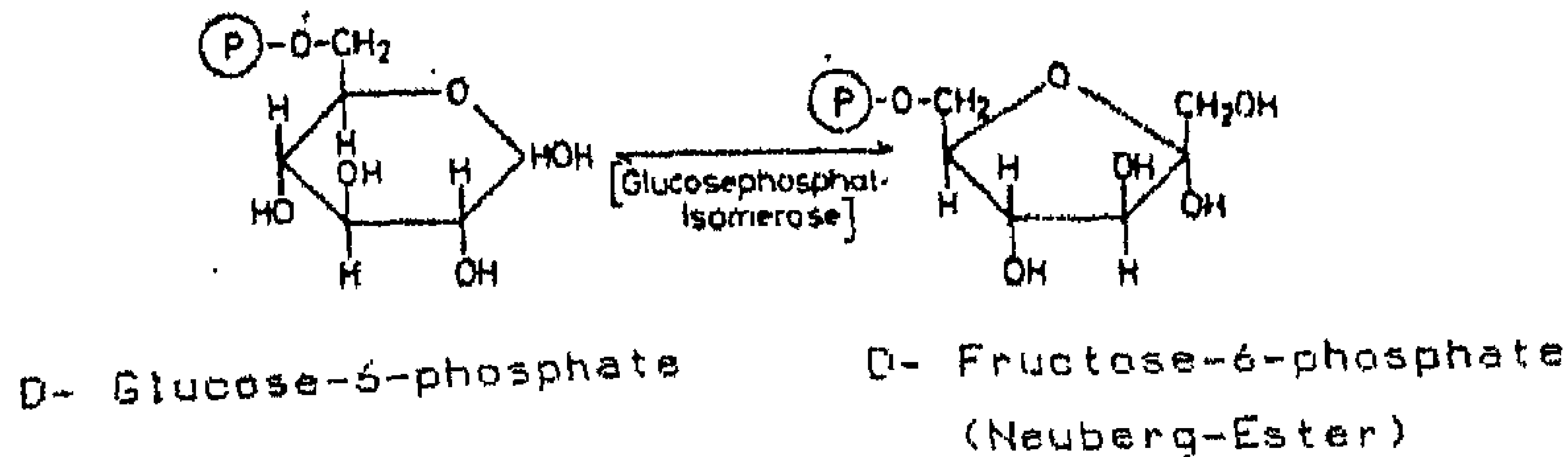
الخطوة الأولى: يتم في هذه الخطوة فسفرة الكلوكوز إلى كلوكوز-6-فسفات ويسمى الناتج إستر روبنسن Robinson ester.



(3-3) ...

تتم هذه الخطوة بفعل أنزيم الهكسوكيناز Hexokinase ويعد كلوكوز-6- فسفات الصيغة الأيضية النشطة للكلوكوز في الخلية الحية.

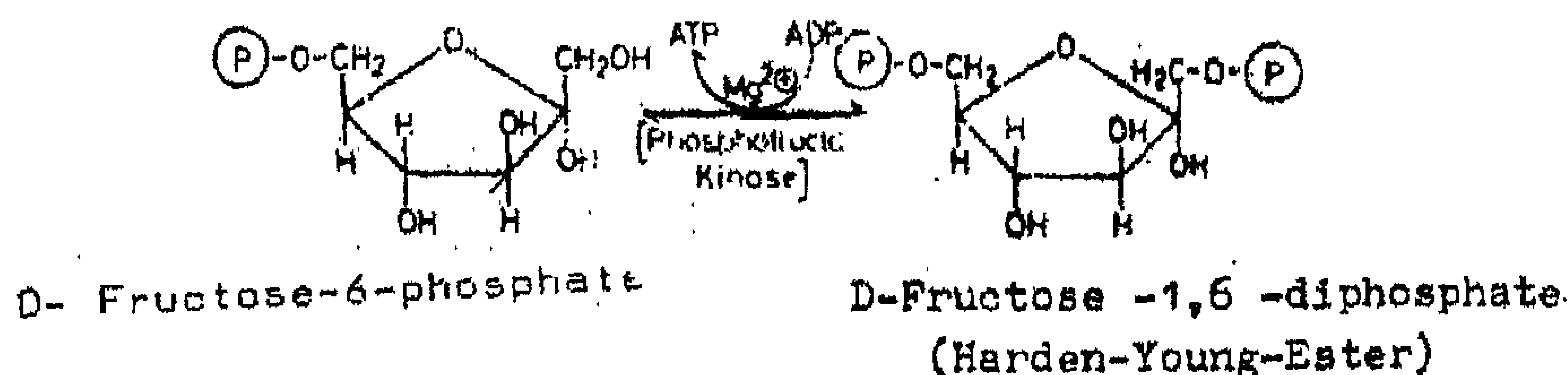
الخطوة الثانية: يتحول الكلوكوز -6- فسفات إلى المركب الإيزومري فركتوز-6- فسفات ويدعى المركب الأخير إستر نوبيرك Neuberg ester:



(4-3) ...

يحفز التفاعل الأنزيم Glucose Phosphate isomerase ويتخصص الأنزيم للركيزتين كلوكوز-6- فسفات وفركتوز-6- فسفات.

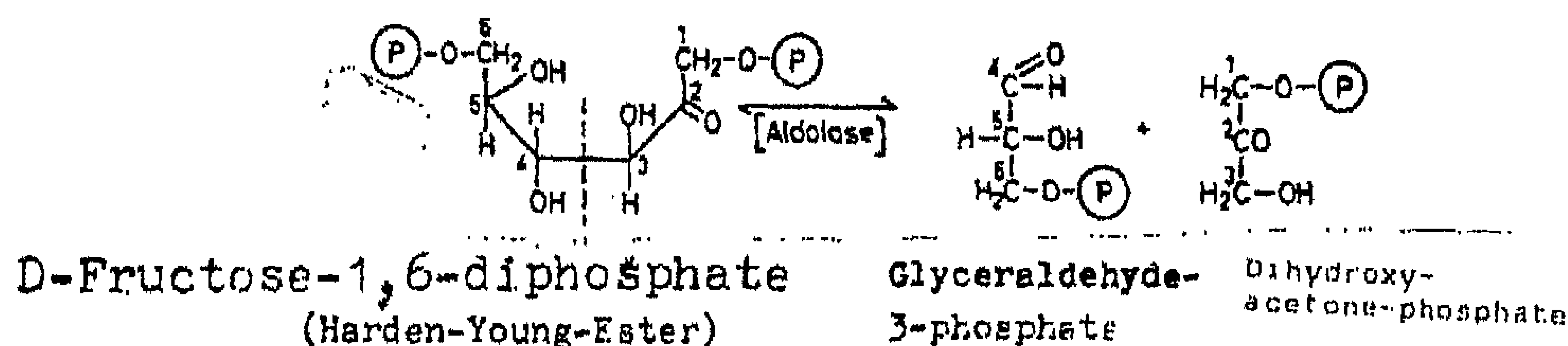
الخطوة الثالثة: يحفز الأنـزيم phospho fruco-kinase(الإسـم النظـامي):- ATP:D phosphotransferase Fruce-6-phosphate-1- تحـول فركتـوز-6- فسفات إلى فركتوز-1-6 ثنائي الفسفات بوجود المركب ATP كمانح لمجموعة الفسفات ويدعى الناتج إستر هاردن- يونك Harden-Young ester



(5-3) ...

يستطيع الأنـزيم Phosphofructo kinase إسـتخدام (GTP) tiphosphate Guanosine أو triphosphate Inosine (ITP) أو cytidine (CTP) triphosphate أو Uridine triphosphate (UTP) بمثابة المركب المانح لمجموعة الفسفات عوضاً عن المركب ATP.

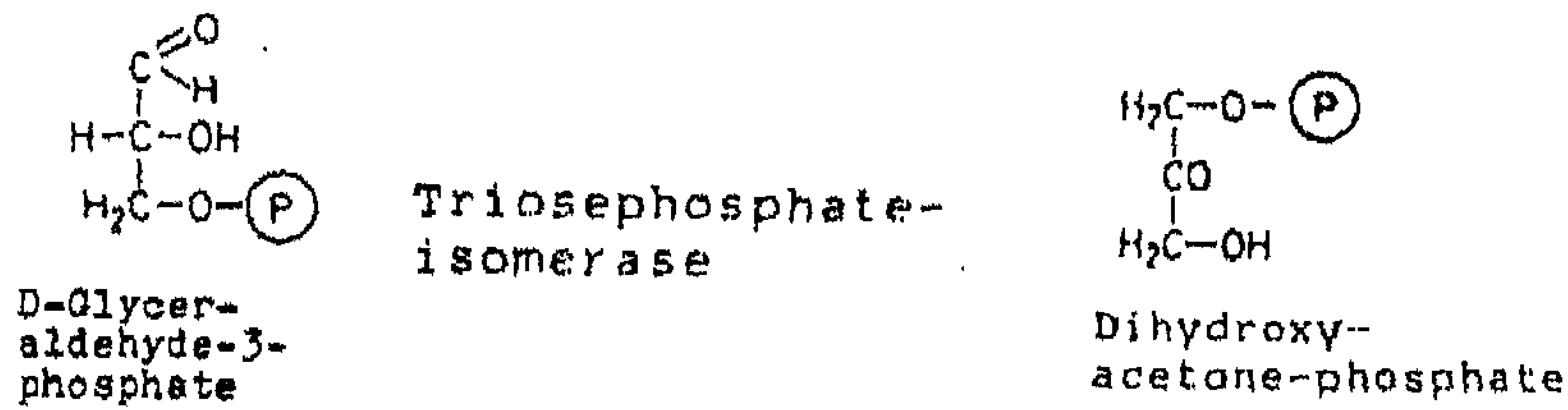
الخطوة الرابعة: وهي الخطوة المميزة للمسلك إذ يتم فيها تحول فركتوز 1-6- ثنـائي الفسفات إلى كلسر الدهيـد-3- فسفات وفسفات الاسـتون ثنـائي الهدروكسل Dihydroxyacetone phosphate بفعل أنـزيم الالـدولاز Aldolase. إن وجود هـذا الأنـزيم في خلايـا أو نسيج معـين يعـني القـدرة علـى تحلـل السـكر بمسلك إمدن-مايروهوف- بارناس.



(6-3) ...

لأنزيم الالدولاز تخصص عال للركيزة فركتوز –1-6 ثنائي الفسفات إن هذا الأنزيم لا يعمل نهائياً في الركيزة فركتوز-6- فسفات ومن المواد المثبطة للأنزيم: ATP وADP و AMP والمركبات المشابهة تركيبا للركيزة مثل L-Sorbose-1.6-bis phosphate- و D-Fructose-6-phosphate.

الخطوة الخامسة: يحفز الأنزيم Triosphosphate isomerase التحول الرجوعي (عكوس، Reversible) بين Glyceraldehyde-3- phosphate و Dihydroxyacetone phosphate.

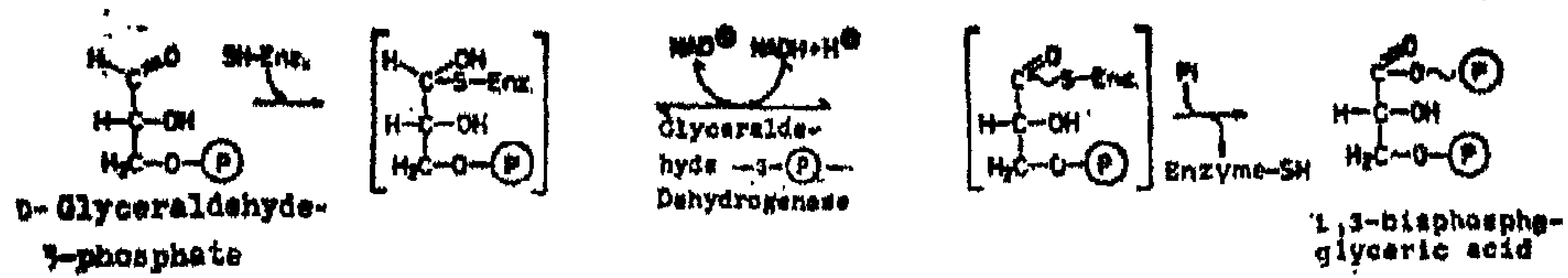


(7-3) ...

يمتلك الأنزيم المحفز للتفاعل رقم تحول عاليا High turnover number ويسمى الأنزيم المرشد لمسلك إمدن- مايرهوف-بارناس- شأنه بذلك شأن أنزيم الالدولاز- إذ أن الكشف عنه في خلية من الخلايا يشير إلى تحلل السكر بالمسلك المذكور.

يثبط الأنزيم Triose phasphate isomerase بالفسفات اللاعضوية Pi.

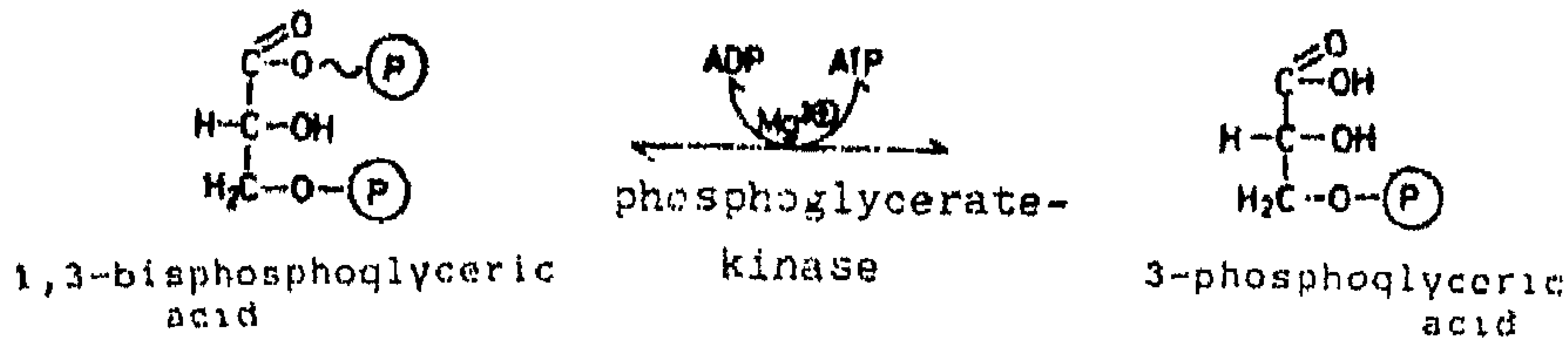
الخطوة السادسة: يتأكسد المركب Glyceraldehyde3- phosphate بوجود الأنزيم Glydceraldehyde-3-phosphate dehyrogenase والتميم الأنزيمي NAD^+ والفسفات اللاعضوية Pi وينتج عن التفاعل 1-3. bisphosphoglyceric acid.



(8-3) ...

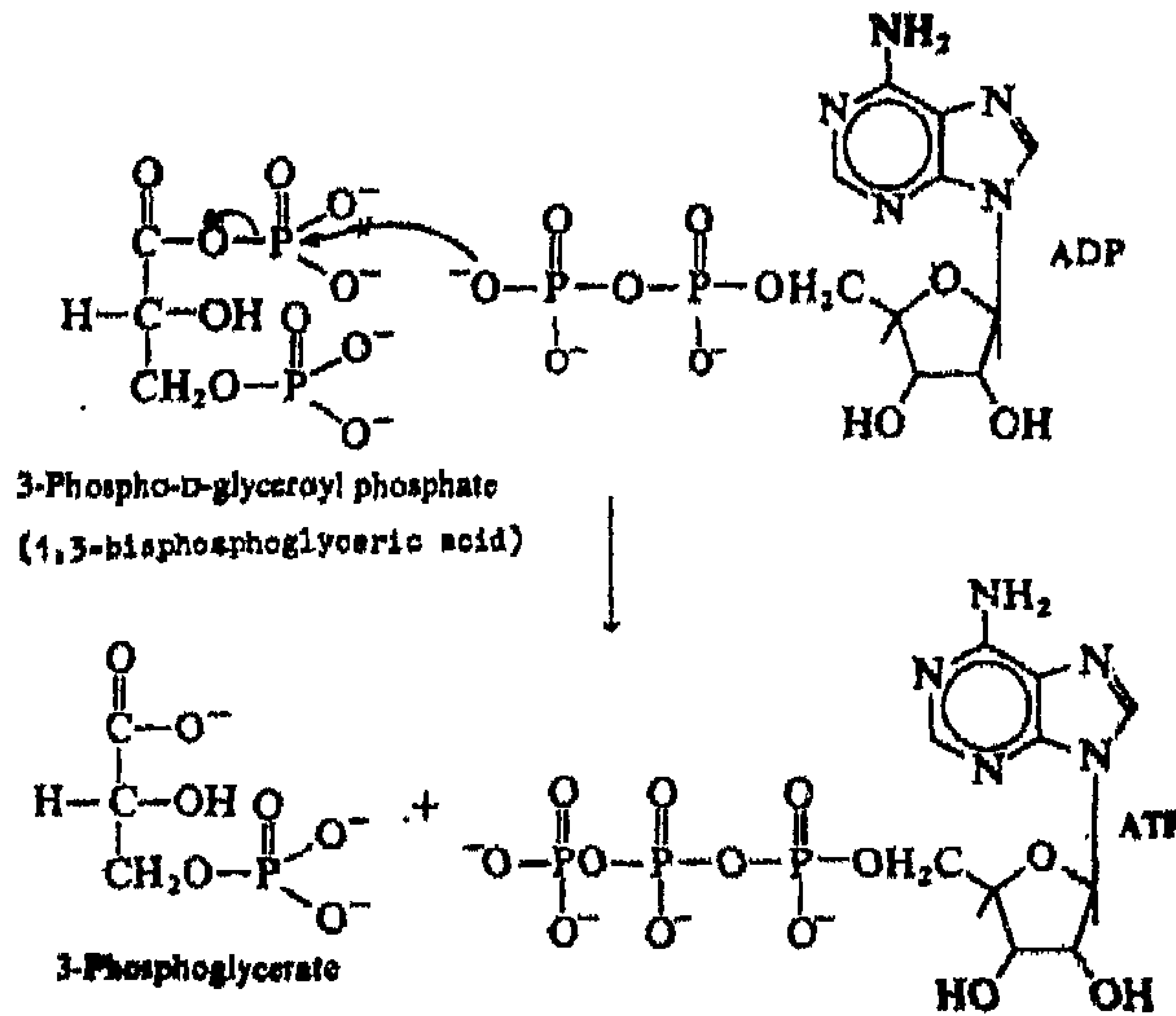
يتضح من المعادلة (8-3) تكون المركب الوسطي (معقد الأنزيم-الركيزة) الذي يتأكسد (بإزالة الهدروجين) ويتحول إلى Acyl-S-enzyme وهذا المركب ثايواستر Thioester غني بالطاقة يتحول بعدئذ إلى المركب Acylphosphate وهو الحامض 1.3-bisphosphoglyceric (1-3. diphosphoglyceric acid) وبذلك تبقى طاقة مركب الثايواستر مخزونة في المركب الأخير.

الخطوة السابعة: تنقل مجموعة الفسفات من المركب 1.3 - bis phosphoglyceric acid إلى المركب ADP وبذلك يتكون المركب ATP عالي الطاقة:



(9.3) ...

إن تكوين المركب ATP بهذه الطريقة يسمى فسفرة على مستوى الركيزة Sub-Strate-level phosphorylation ويمكن توضيح آلية التفاعل بالمعادلة الآتية:



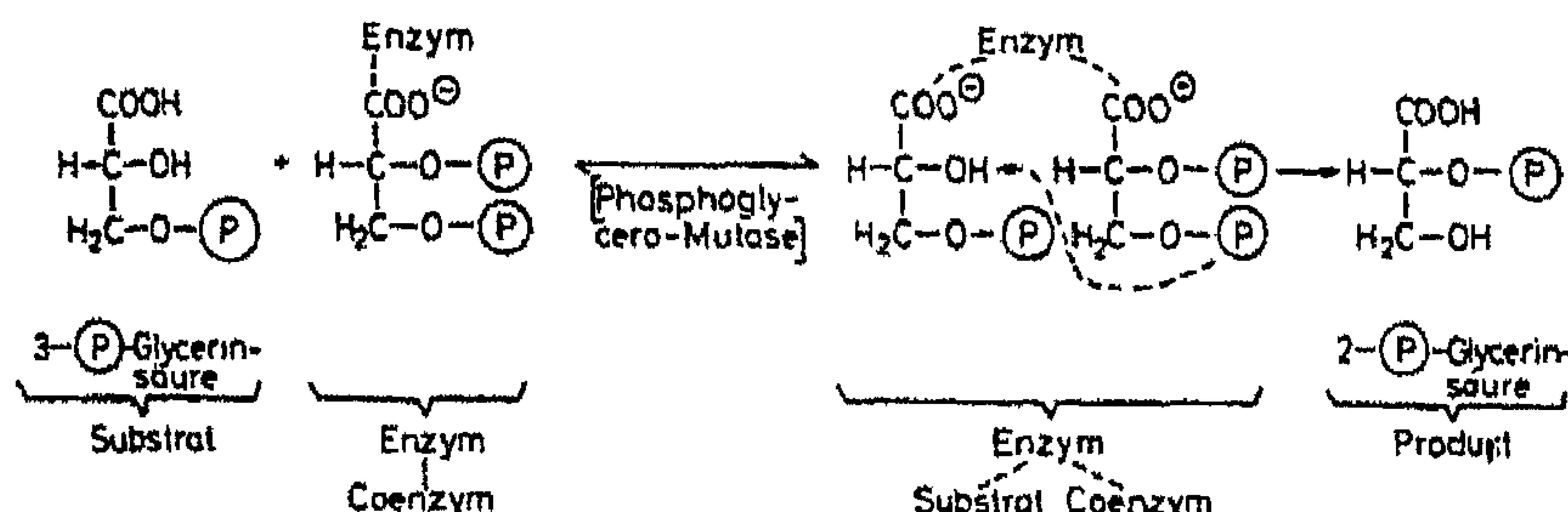
(10 -3) ...

يتكون في هذا التفاعل- نتيجة لأكسدة جزيئتي سكر ثلاثي الكربون- جزيئتي ATP من مجموع الجزيئات الأربع الناتجة عن مسلك امدن- مايرهوف- بارناس.

يعد الأنزيم Phosphoglycerate kinase المحفز للتفاعل، شديد التخصص ولا يستطيع استخدام AMP (Adenosine monophosphate) أو pyruvate phosphoenol أو bisphospho-D-glycerate -2.3 بمثابة ركائز ويحتاج في عمله إلى أيون المغنيسيوم، إذ أن الركيزة الحقيقة للأنزيم هي المعقد Mg-ATP.

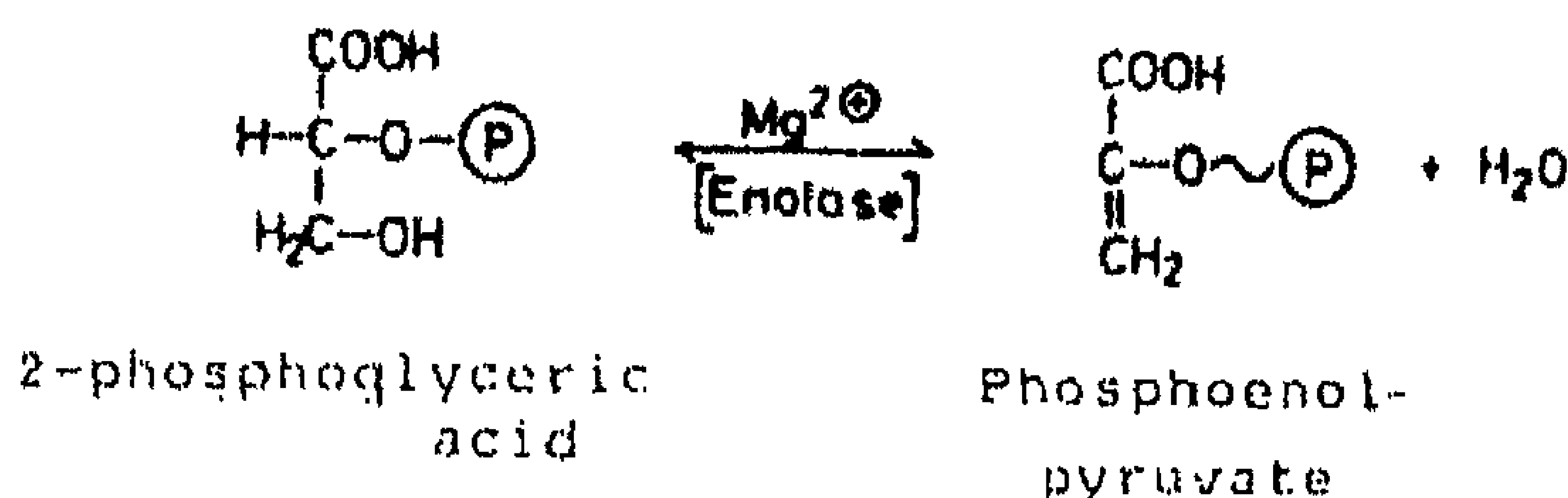
الخطوة الثامنة: يتحول المركب phosphoglyceric -3 إلى Phosphoglyceric-2 بواسطة الأنزيم Phosphoglyceromutase. يعمل المركب pho -phoglycerate 2.3-bis وصفه تميما أنزيميا إذ يعمل الأنزيم على نقل مجموعة الفسفات من الموقع 3 للتميم الأنزيمي إلى الموقع 2 للركيزة بعد ارتباطها بالأنزيم وبهذا يتكون المعقد enzyme-Coenzyme Substrate- الذي يتفكك بعد ذلك لإعطاء المركب 2-phos–phoglycerate الناتج عن إزالة الفسفات من

التميم الأنزيمي- والمركب Bis 2.3 Phosphoglycerate نتيجة لفسفرة الركيزة ويعمل المركب الأخير بمثابة تميم أنزيمي من جديد :



(11 ـ 3) ....

الخطوة التاسعة : يتكون في هذه الخطوة المركب Phosphoenol pyruvate من المركب 2-acid Phosphoglyceric بواسطة الأنزيم Enolase الذي يتطلب وجود أيونات المغنيسيوم في عمله :



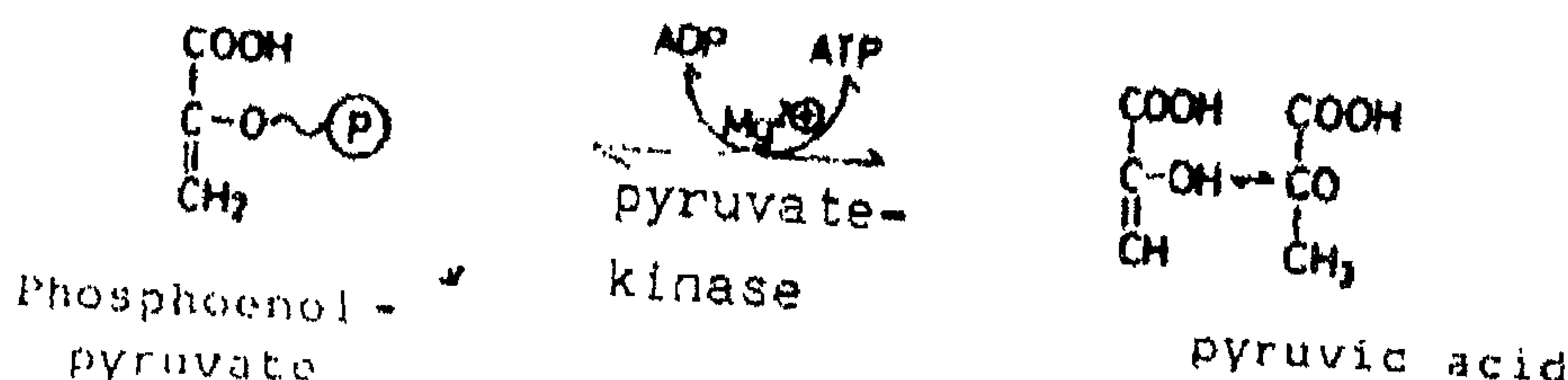
(12 ـ 3)

إن ناتج التفاعل Phosphoenol pyruvate استر اينولي Enol ester وهومركب عالي الطاقة.

يمكن تثبيط أنزيم الاينولاز- وبالتالي الإختمار- باستعمال أيونات الفلوريد F^- إذ تؤدي إلى تراكم حوامض الفسفوكلسيرول Phosphoglyceric acids ويعود تأثير أيونات الفلوريد إلى تكوين المعقد Mg-Fluorophosphate الذي يعد المثبط الحقيقي للأنزيم إذ يرتبط في الموقع النشط. قد يعود مفعول حماية الأسنان من قبل أيونات الفلوريد إلى تثبيط تحلل السكر علما بأن الفلوريد يستخدم في

بعض أنواع معجون الأسنان كما ينصح بطلاء أسنان الأطفال بالفلوريد للغرض نفسه.

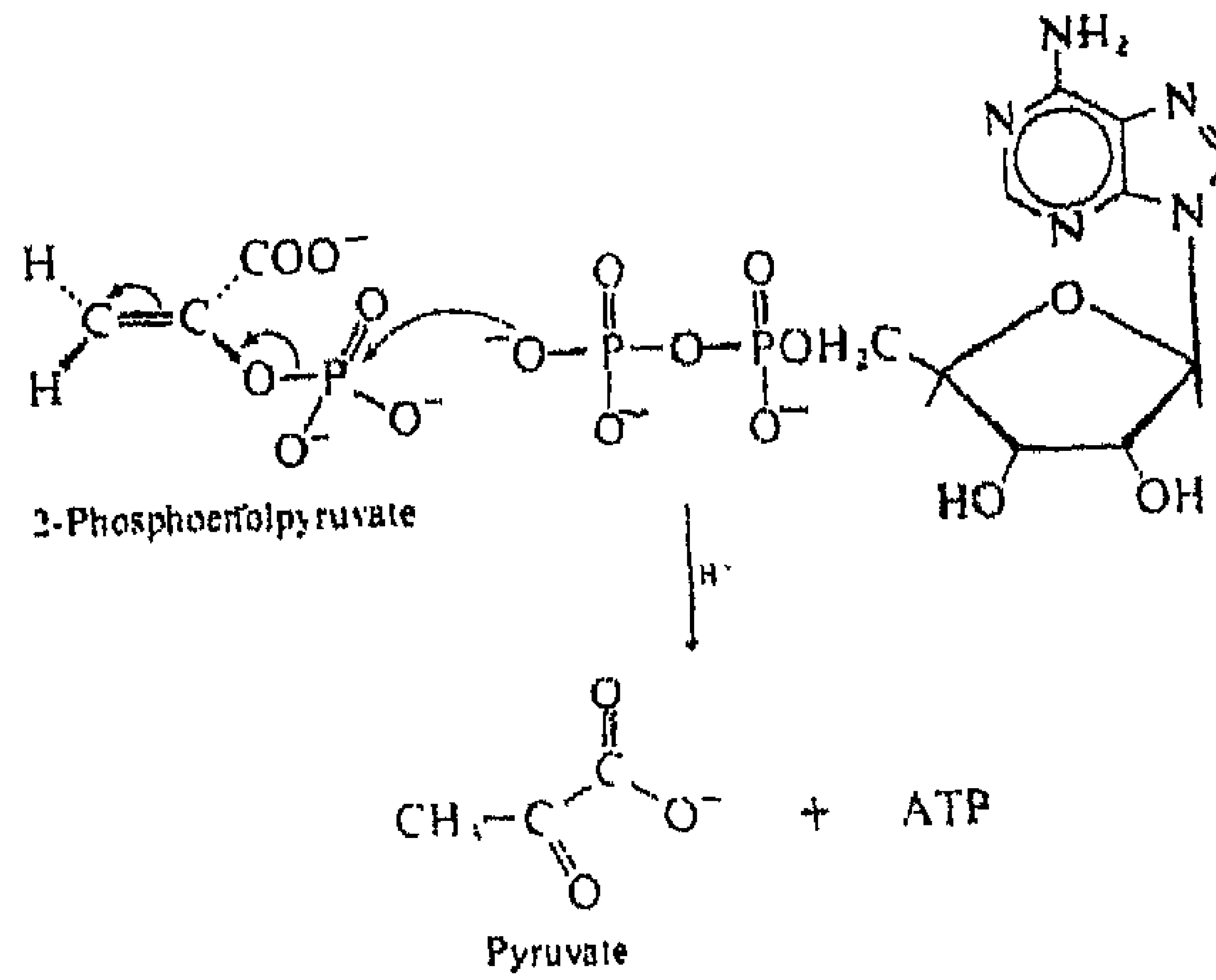
الخطوة العاشرة: يتم في هذه الخطوة تكوين ATP بالفسفرة على مستوى الركيزة (انظر الخطوة السابعة) بفعل أنزيم Pyruvate kinase الذي يؤدي إلى نقل مجموعة الفسفات من المركب عالي الطاقة phosphoenol pyruvate إلى المركب ADP.



(13-3) ...

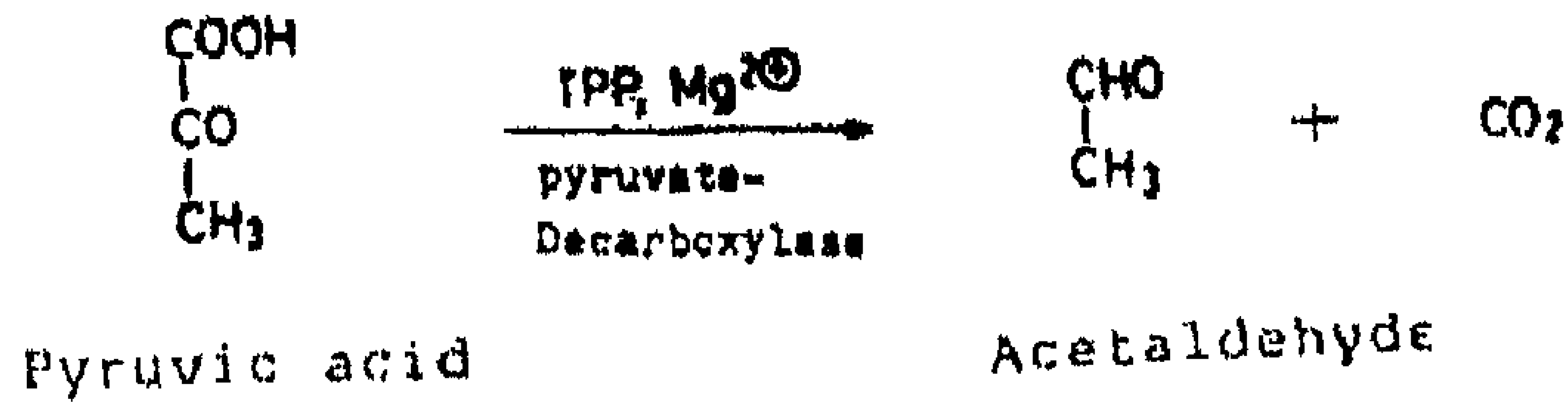
ويمكن توضيح آلية التفاعل بالمعادلة الآتية:

وبذلك تتكون جزيئتان ATP من جزيئتي Phospoenol pyruvate الناتجتين عن تحلل جزيئة سكر الكلوكوز. تمثل جزيئتا الATP الناتجتان من هذه الخطوة مع الجزيئتين المتكونتين في الخطوة السابعة نتاج Out put مسلك امدن-مايرهوف- بارناس من الطاقة الكيميائية وإذا ما أخذنا بنظر الإعتبار استهلاك جزيئتي ATP في الخطوة الأولى والخطوة الثالثة تكون حصيلة للمسلك جزيئتا ATP.



(14-3) ...

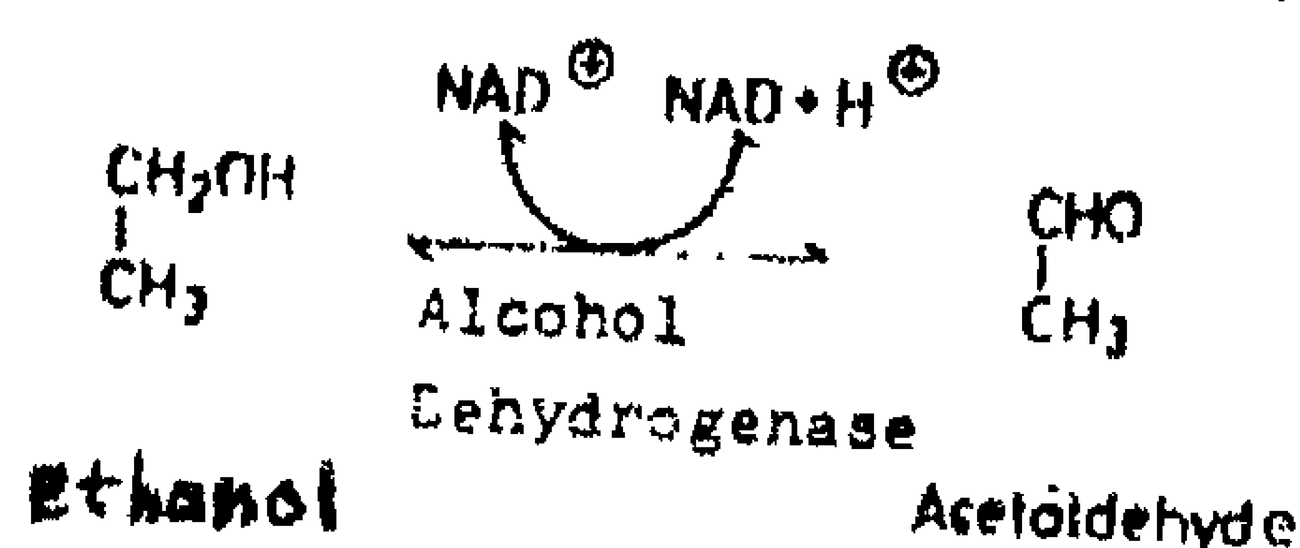
الخطوة الحادية عشرة: يتحول حامض البيروفك إلى استيالدهيد و CO_2 بواسطة الأنزيم Pyruvate decarboxylase.



(15-3) ...

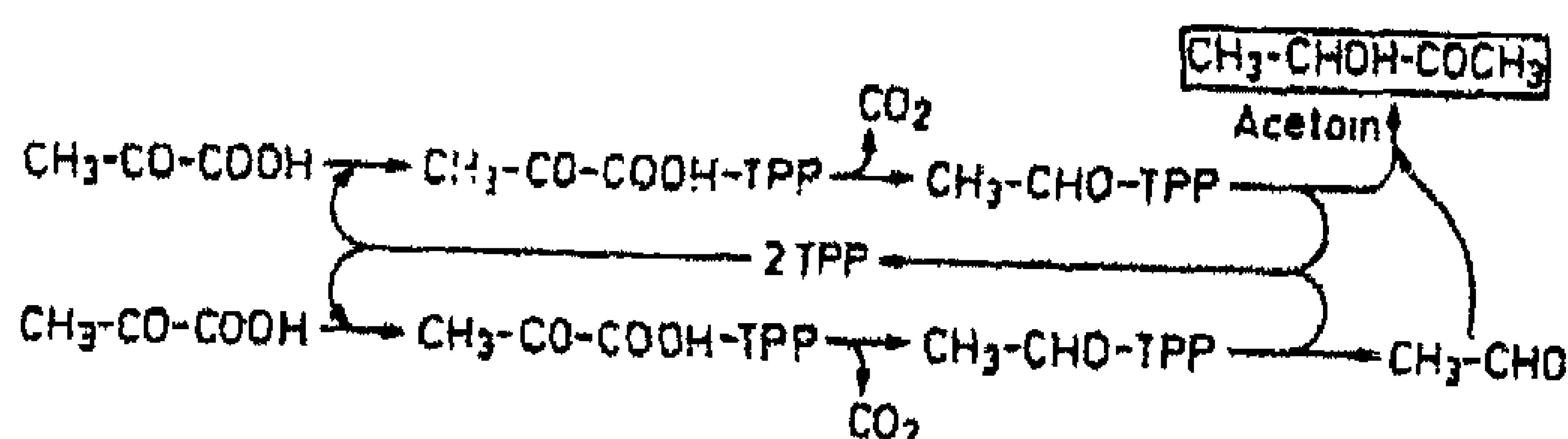
إن هذا التفاعل غير رجوعي (غير عكسي) ويحتاج الأنزيم في عمله إلى Thiamine pyrophosphate (TPP) كتميم أنزيمي Coenzyme وكذلك Mg^{+2} بمثابة تميم العامل Cofactor. يتكون خلال التفاعل بوصفه مئيضة وسطية Intermediate metabolite البيروفات الفعالة pyrucate-TPP وعند انفصال CO_2 عن البيروفات الفعالة يتكون الاستالدهيد الفعال (Acetaldehyde-TPP) (Active acetaldehyde)

الخطوة الثانية عشرة: يتحلل الإستالدهيد الفعال- الناتج عن العمليات الأيضية أعلاه (التي تحصل في الخميرة)- إلى مكوناته من الTPP والاستالدهيد ويختزل المركب الأخير إلى الإيثانول بفعل الأنزيم Alcohol dehydrogenase وبوجود التميم الأنزيمي NAD^+.



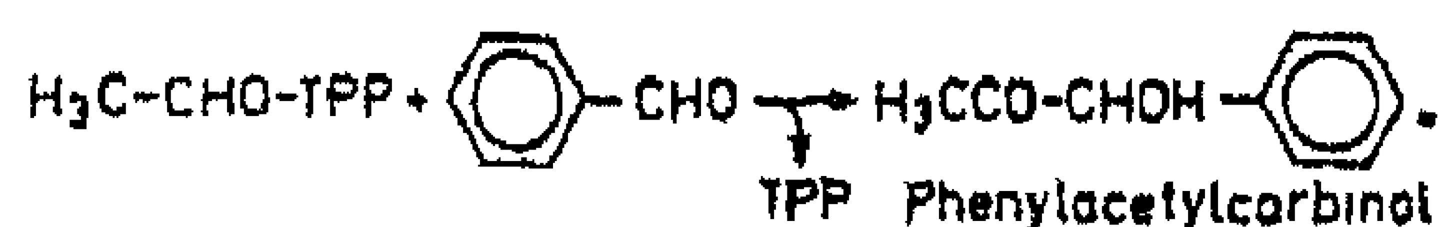
(16-3) ...

وعندما يتكاثف جزء الاستالدهيد من الاستالدهيد الفعال Acetaldehyde-TPP مع الاستالدهيد الحر يتكون المركب Aceylmethyl (Carbinol) Acetion ويمكن توضيح ما تقدم بالمعادلات الآتية:



(17-3) ...

إن إضافة الدهيد آخر-غير الاستالدهيد- إلى الخميرة وفي أثناء عملية الإختمار يؤدي إلى تكوين خليط من ال Acyloin فمثلا عند تفاعل الاستالدهيد الفعال مع البنزالدهيد Benzaldehyde يتكون phenylacetyl Carbinol.



(18-3) ...

يستخدم المركب Phenylacetyl Carbinol الفعال ضوئيا والمحضر بهذه الطريقة لتخليق العقار L-Ephedrine إذ يشابه في عمله هورمون الإدرينالين فهو يرفع ضغط الدم ويحفز الجهاز العصبي المركزي وينصح بأخذه عادة في حالات الربو Asthma.

يمكن استغلال التفاعل المحفز بالأنزيم Alcohol dehydrogenase والمذكور آنفا، لتعيين الإيثانول كميا. عند وجود الخميرة في محيط حامضي ضعيف PH=5 ← 60)

❖ Acyloin: عبارة عن كحولات كيتونية تحوي الثمالات الهدروكربونية نفسها على جانبي المجموعة $-CH(OH)-CO-$ لذلك يعد phenylacedtyl Carbinol خليط من الـ Acyloin لوجود ثمالتين مختلفتين على طرفي المجموعة $-CH(OH)-CO-$



$$.CH_3-CH_2OH+NAD^+ \rightarrow CH_3-CHO+NADH+H^+$$

(19.3) ..

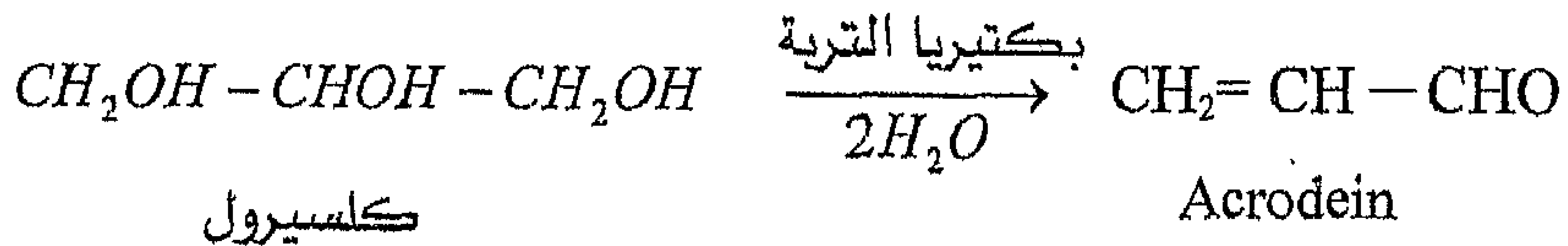
يتجه التفاعل أعلاه من اليمين إلى اليسار أي باتجاه تكوين الإيثانول ولكنه يحصل بالإتجاه المعاكس (أي بتكوين الإستالدهيد) إذ وجدت الخميرة في محيط قاعدي ضعيف. فإذا أضيف المركب Sermicarbazide إلى أنبوبة الإختبار الحاوية على داريء قاعدي ضعيف يرتبط الاستالدهيد المتكون مع الـSemicarbazide ويمكن تقدير الناتج- وبالتالي الإيثانول المتفاعل- بصورة كمية.

تستطيع الخميرة استخدام جزء قليل من مكافئات الإختزال الناتجة عن الخطوة السادسة لإختزال كمية قليلة من فسفات الاستون ثنائي الهدروكسيل الناتج عن الخطوة الخامسة وبذلك يتكون الكلسيرول -3- فسفات ويتم هذا بفعل الأنزيم Glycerol-3 dehydrogenase phosphate- (شكل 3-4) وعند

انفصال مجموعة الفسفات من الكلسيرول -3- فسفات يتكون الكلسيرول الذي يوجد دائما بوصفه ناتجا ثانويا في الإختمار الكحولي ويمكن زيادة تكوين الكلسيرول إلى درجة كبيرة إذا تم التقاط الاستدالدهيد خلال عملية الإختمار بكاشف كاربونيلي Carbonyl reagent وكمثال Sodium hydrogen sulfite .

يمكن توضيح فعل الكبريتيت Sulfite في إنتاج الكلسيرول في الشكل (3-4) حيث يتضح من الشكل توقف سلسلة تفاعلات تكوين الإيثانول عند تكوين Acctaldehyde-Sulfonate واتجاه التفاعلات لتكوين الكلسيرول. وبهذه الطريقة يمكن صناعياً إنتاج الكلسيرول من السكر المختمر إذ يتحول 30٪ من السكر إلى كلسيرول.

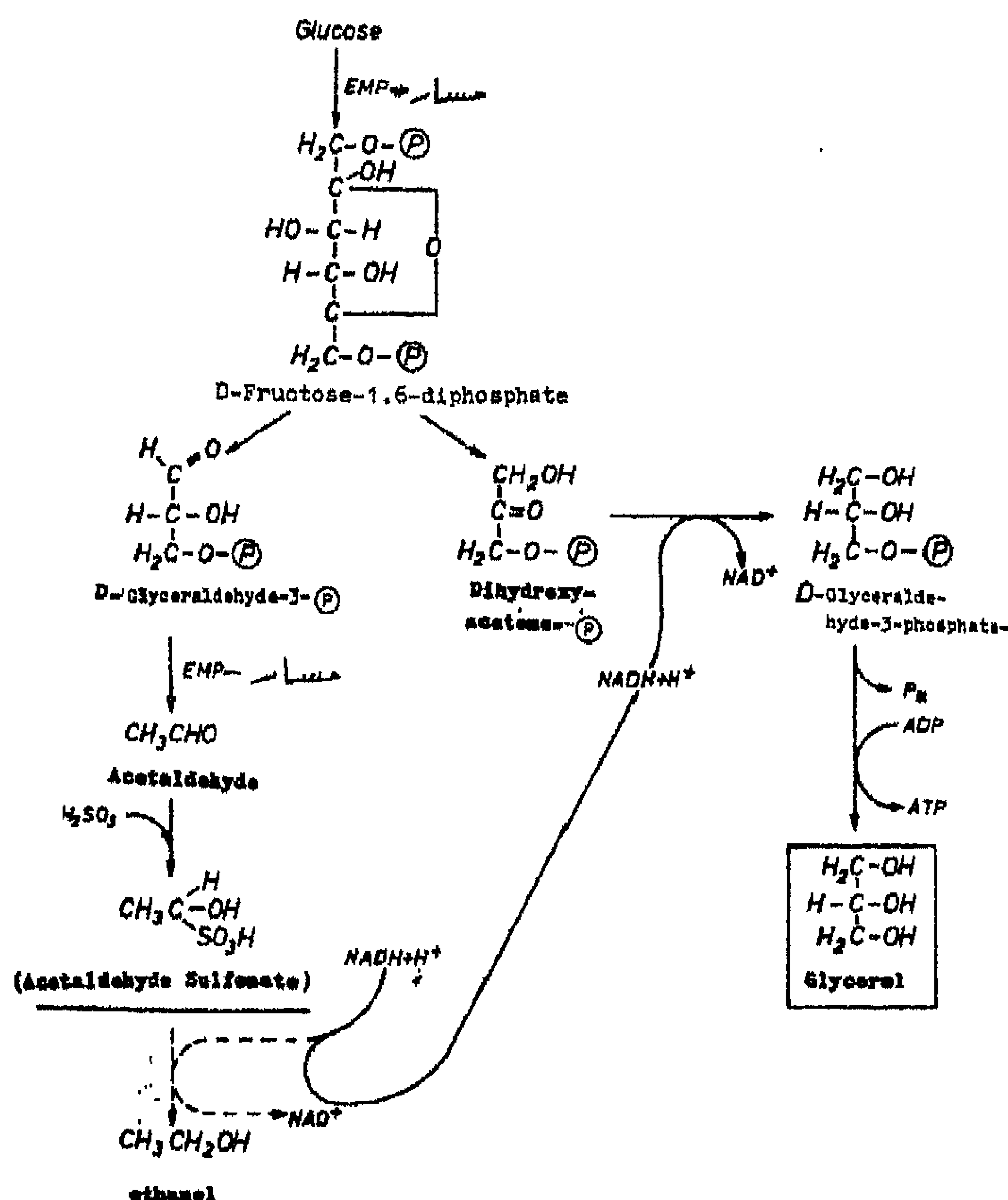
يمكن في بعض الحالات تحويل الكلسيرول المتكون في الإختمار الكحولي إلى مركب الاكرولين Acrolein بفعل بكتيريا التربة كما في المعادلة الآتية:



$$CH_2OH - CHOH - CH_2OH \xrightarrow[2H_2O]{\text{بكتيريا التربة}} CH_2{=}CH - CHO$$

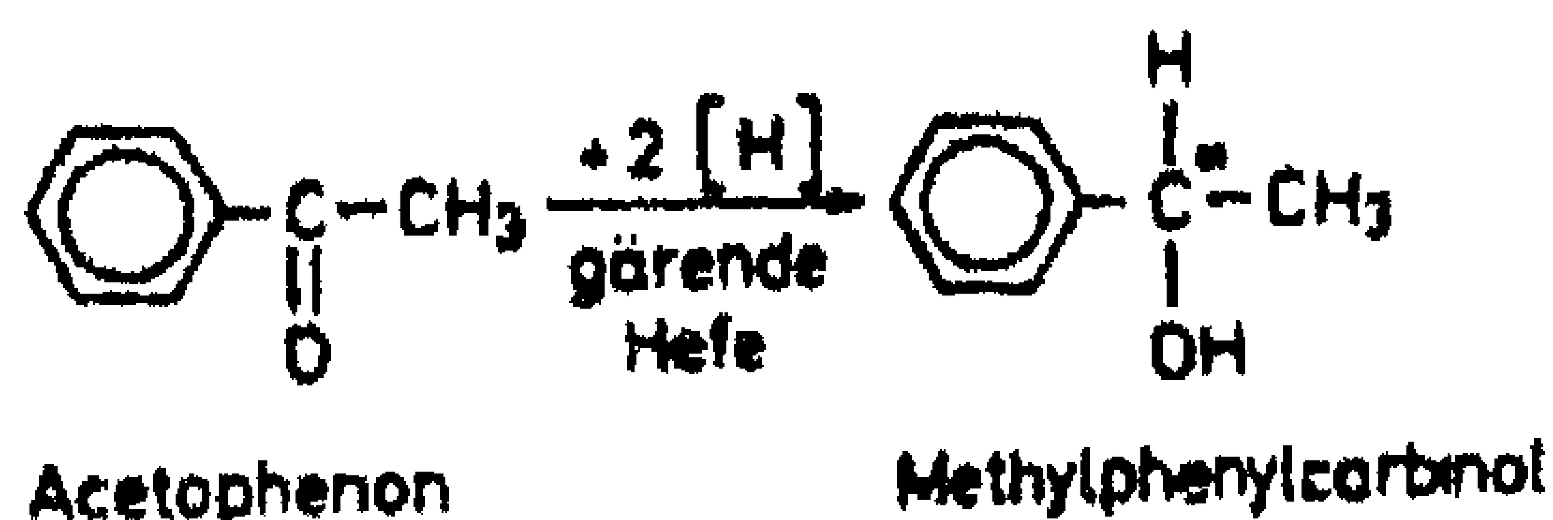
كلسيرول ... Acrodein

(21-3) ...



شكل (3-4) فعل الكبريتيت في توجيه الاختمار لتكوين الكلسيرول عوضا عن الإيثانول

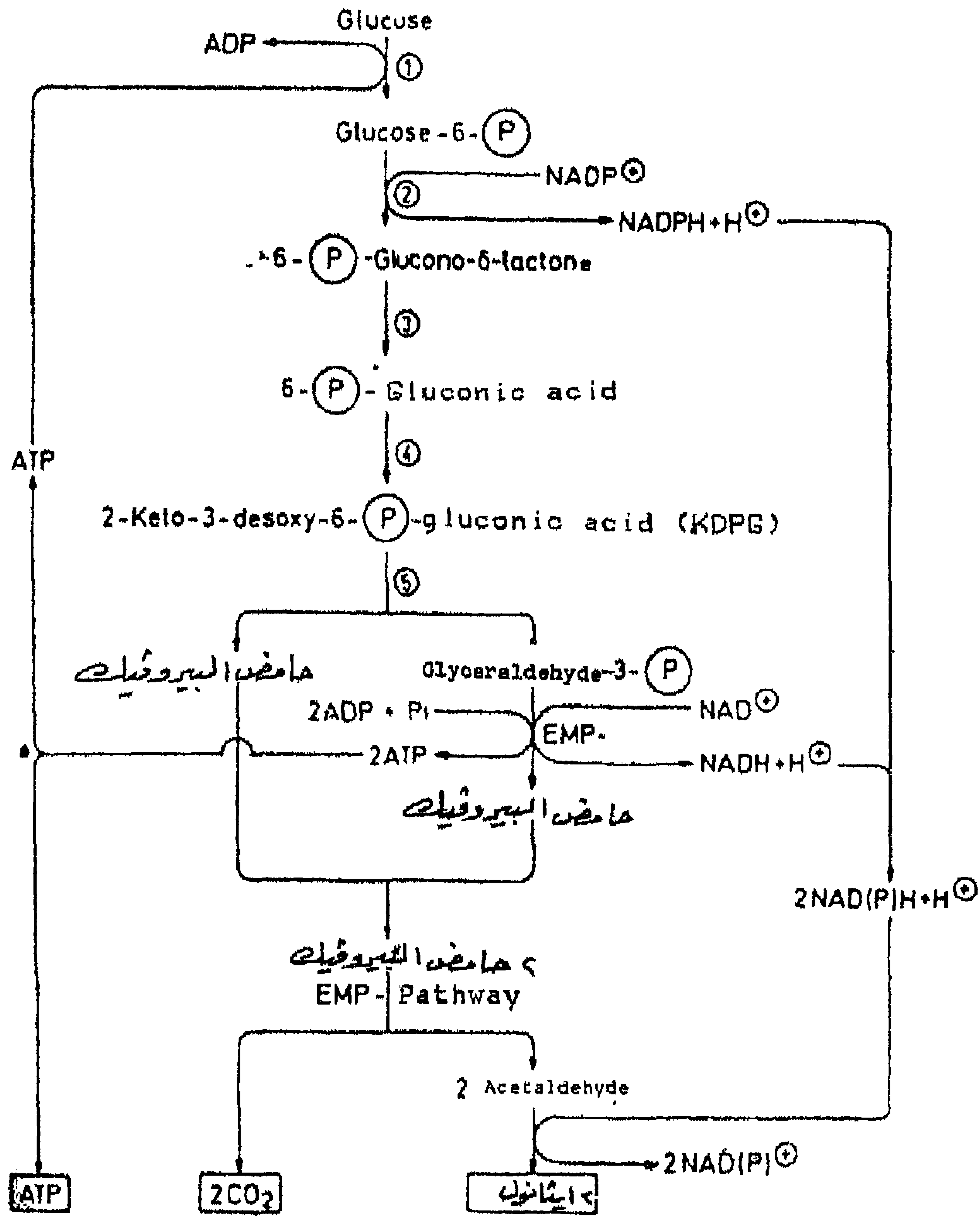
إضافة إلى استخدام مكافئات الاختزال التي تنتج في أثناء الاختمار لاختزال المركبات الفسلجية المتكونة مثل الإستيالدهيد وفسفات الأستون ثنائي الهدروكسيل، يمكن استغلال هذه المكفئات لاختزال مركبات غير فسلجية تضاف بصورة بطيئة في أثناء الاختمار. إن هذا النوع من الهدرجة الحيوية بالخمائر ذو أهمية وخاصة عندما يكون الناتج المختزل فعالاً ضوئياً إذ يتكون واحد فقط من الإيزو مرين المتكونين فيما لو تم الاختزال كيميائياً:



(22-3) ...

إضافة إلى الخميرة Saccharomyces cerivisiae تمكن Lindner من عزل بكتيريا قاعدة على الإختمار الكحولي وسميت آنذاك Thermobacterium mobile وتسمى الآن Pseudomonas Lindneri. تم عزل هذه البكتيريا من عصير مكسيكي مختمر يسمى Agavin juice وينتج منه شراب يدعى -Pulque. تخمر هذه البكتيريا الكلوكلوز بمعادلة إجمالية مماثلة للخميرة. وإضافة إلى ذلك وجد العالمان Entner و Doudoroff عام 1952 إن تفويض الكلوكوز لاهوائياً بواسطة هذه البكتيريا يسلك طريقاً آخر يسمى اليوم تقويض انترودودوف كما يسمى مسلك KDPG(شكل 3-5) نسبة إلى المركب الوسطي المميز 2-Keto-3-deoxy-6- phosphogluconic acid.

يحصل التقويض بهذا المسلك في عدد محدود جداً من أجناس البكتريا وينتمي لهذا العدد المحدود ، الأجناس Pseudomonas و Xanthomonas و Aeromonas

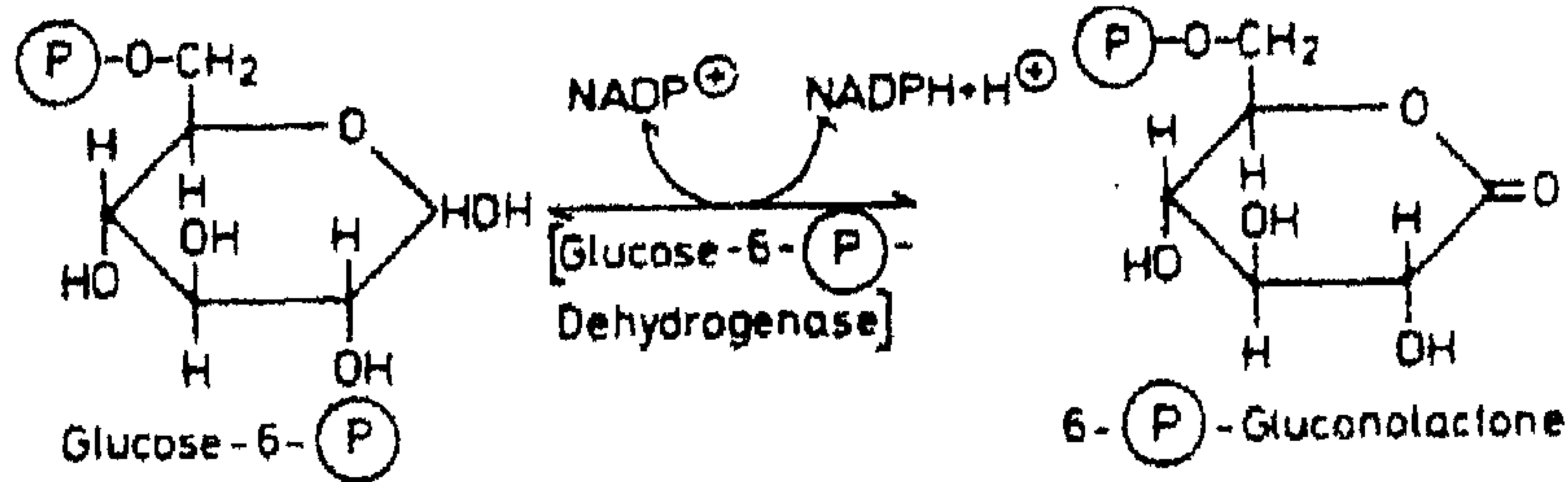


شكل (3-5) تقويض انتز ودودوروف Entner- Doudoroff للكلوكوز. تكون الطاقة الناتجة بهذا المسلك أقل مما هي عليه بمسلك أمدن – مايرهوف- بارناس إذ ينتج جزيئة واحدة فقط ATP في مسلك أمدن – ماير هوف- بارناس.

يمكن توضيح تفاعلات مسلك انتنر ودودوروف (ITDPG) كما يأتي:

الخطوة الأولى: يبتدىء تقويض الكلوكوز بتحويله إلى كلوكوز -6- فسفات كما في مسلك امدن- مايرهوف-بارناس EMP.

الخطوة الثانية: تزال ذرتا هدروجين من الكلوكوز –6– فسفات لتكوين –6 phosphogluconolactone.

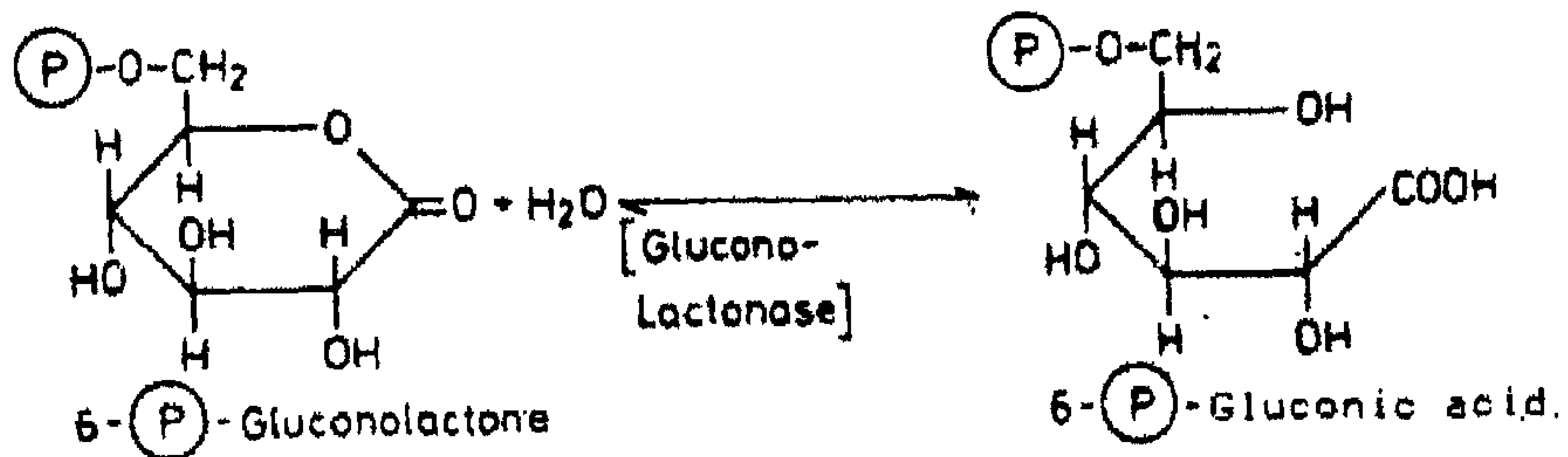


(23-3) ....

يتضح من المعادلة أعلاه بأن التميم الأنزيمي للتفاعل $NADP^+$ ويظهر الأنزيم Glucose –6– phosphate dehydrogenase تخصصاً شديداً للركيزة كلوكوز–6– فسفات.

الخطوة الثالثة: يتحول المركب phosphogluconolactone إلى 6–-phos–6 Phogluconic acid

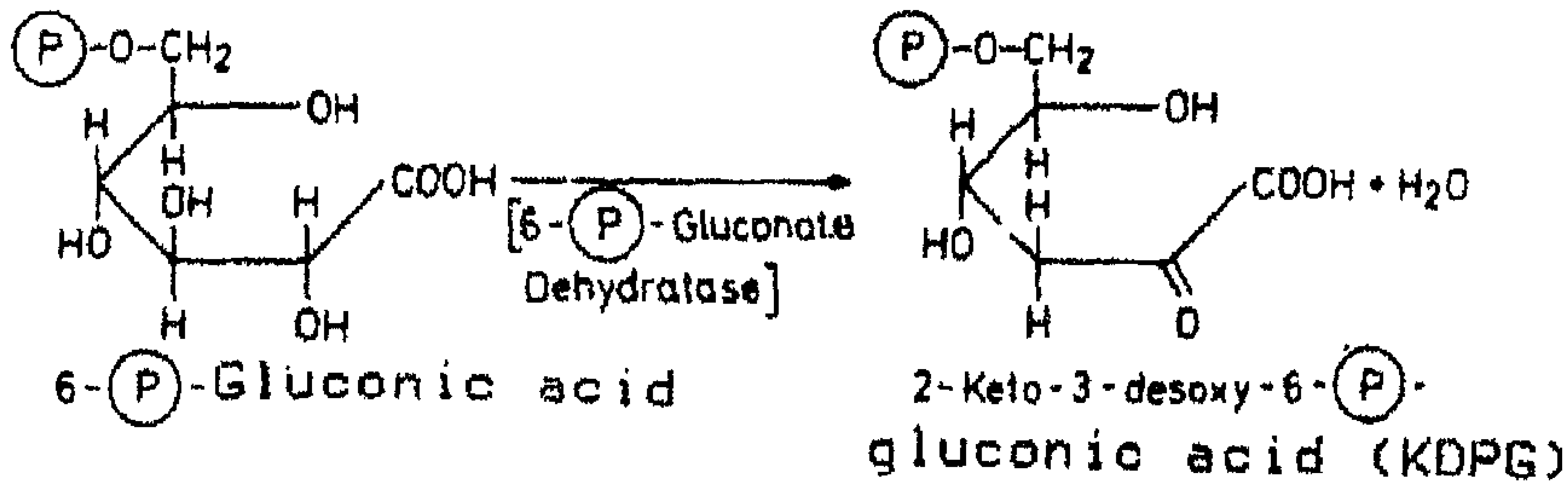
ويحصل التفاعل بسرعة بواسطة الأنزيم Gluconolactonase:



(24-3) ....

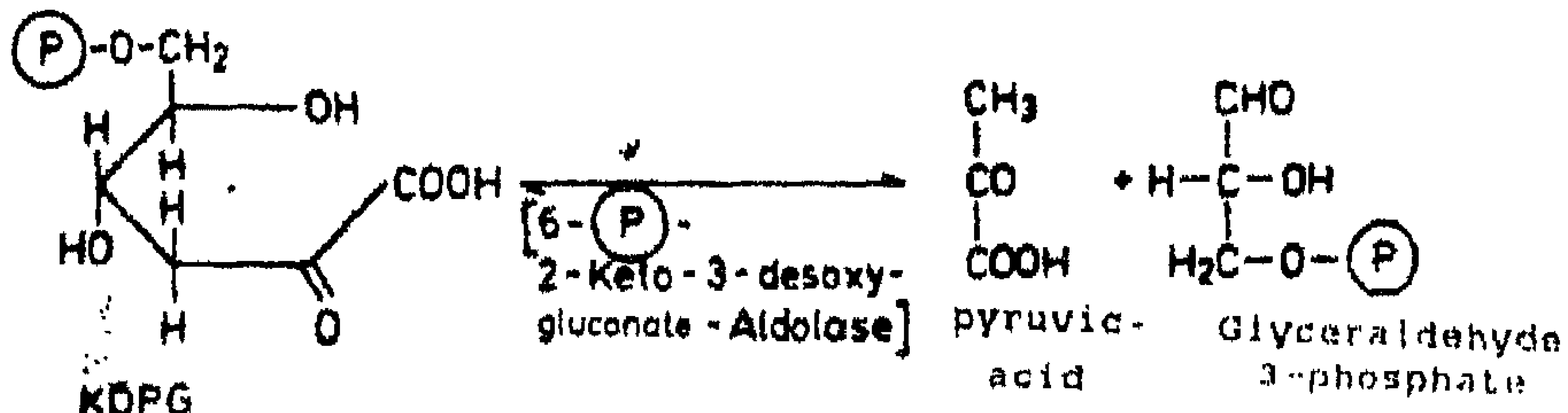
يستطيع الأنزيم المذكور مهاجمة المركبين Glucono -δ-lactone و– D وD-Lactone-δ-Glucono إضافة إلى المركب phosphoglucono –8–lactone– 6 كما أنه يحتاج إلى أيونات Mg^{+2} أو Mn^{+2} أو CO^{+2} بوصفها تميمات العامل.

الخطوة الرابعة: يمثل تحول 6– phosphogluconic acid إلى KDPG (2-
Keto –3–deoxy –6–phospho –D gluconate تفاعلا مميزا لهذا المسلك ويتم بفعل الأنزيم Phosphogluconate dehydratase الذي يعد الأنزيم المرشد لمسلك KDPG



(25–3) ....

الخطوة الخامسة: يتحول المركب KDPG بفعل أنزيم "قائد" Key enzyme آخر في هذا المسلك 2-Keto–3 –deoxygluconate –aldolase إلى بيروفات وكلسيرالدهيد–3– فسفات، ولهذا الأنزيم تخصص عال جدا للركيزة



(26–3) ....

تستطيع ناتجا التفاعل وهما البيروفات وكلسر الدهيد– 3– فسفات التحول إلى CO_2 وايثانول عن طريق مسلك امدن– مايرهوف– بارناس EMP.

3-1-1-2 الاختمار اللاكتيكي

تستطيع بعض أجناس البكتريا أن تخمر الكلوكوز لاهوائيا إلى حامض اللاكتيك ويستغل الاختمار اللاكتيكي للحصول على منتجات الألبان المختلفة وفي المعجنات الحامضية ولتحضير Saur kraut كما يستغل الإنتاج الصناعي لحامض اللاكتك في تكنولوجيا الأغذية وفي الصيدلية.

لحامض اللاكتيك دور بارز من الناحية الفسلجية في الحيوانات حيث يتكون في العضلات عند شحة الأوكسجين فيها وكمثال عند التمرين المجهد. تتشابه تفاعلات الإختمار اللاكتيكي في العضلات والبتكيريا إلا أنها تختلف عن الإختمار الكحولي في الخميرة ذلك أن البيروفات تختزل مباشرة في الاختمار اللاكتيكي أو تحلل السكر Glycolysis وتتحول إلى حامض اللاكتك بينما تعاني من إزالة مجموعة الكربوكسيل Decarboxylation وتتحول إلى استالدهيد في الإختمار الكحولي.

تفتقر الحيوانات ومعظم البكتريا إلى الأنزيم المحفز للتفاعل المذكور والمسمى pyruvate decarboxylase وبهذا تكون غير قادرة على الإختمار الكحولي.

أنواع الإختمار اللاكتيكي: هناك نوعان من الإختمار اللاكتيكي وهما:

أ. الإختمار اللاكتيكي متماثل التخمر

Homofermentative lactic acid fermentation

ب. الاختمار اللاكتيكي متغاير التخمر

Heterofermentative lactic acid frmentation

أ- الاختمار اللاكتيكي متماثل التخمر:

يحصل هذا النوع من الاختمار في بعض أجناس البكتريا مثل Lactobacillus و Sporolactobacillus حيث تقوم هذه الأجناس بدرجة رئيسية

- بتخمر السكريات سداسية الكربون Hexoses إلى حامض اللاكتك وتتكون كميات ضئيلة جدا من مركبات أخرى مثل الأحماض المتطايرة والإيثانول وحامض الفيومارك و CO_2. تستطيع البكتريا Lactobacillus delbruckii تحويل 95٪ من السكر المختمر إلى حامض اللاكتك ويمكن المعادلة الإجمالية لهذا النوع من الإختمار كما يأتي:



$$C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2p_i \rightarrow 2CH_3 - CHOH - CCOH + 2ATP.$$

(27-3)...

تماثل التفاعلات الوسطية للاختمار اللاكتيكي متماثل التخمر نظيراتها في الإختمار اللاكتيكي في مخطط EMP ابتداء من تكوين الكلوكوز-6-فسفات وانتهاء بتكوين حامض البيروفك. أما الخطوة التالية في الإختمار اللاكتيكي وهي تحول حامض البيروفك إلى حامض اللاكتك فهي مميزة لهذا الإختمار وتحصل بمساعدة نوعين من الإنزيمات المتخصصة فراغيا، أحدهما L- (+) -Lactate dehydrogenase ويحفز التفاعل الآتي:



$$-L\ (+)\ -Lactate + NAD^+ \rightleftharpoons Pyruvate + NADH + H^+ . \quad (28-3) ...$$

وثانيهما D- (-) Lactate dehydrogenase ويحفز التفاعل الآتي:



$$D(-)\ -Lactate + NAD^+ \rightleftharpoons Pyruvate + NADH + H^+ \quad (29-3) ...$$

يتكون في الاختمار اللاكتيكي عادة مزيج رزيمي Racemic mixture دلالة على وجود كلا النوعين من الأنزيمات. إلا أن بعض أنواع البكتريا العقدية Streptococcus تنتج فقط الإيزومر L(+) Lactic acid كما أن بعض أنواع البكتريا الملبنة Lactobacillus تنتج فقط D (-) -Lactic acid على عكس الحالة مع البكتريا Lactobacillus plantarum التي تنتج كلا الإيزومرين. وفي بعض الأحيان يستطيع الكائن المجهري ذاته تكوين ايزومرات مختلفة لحامض

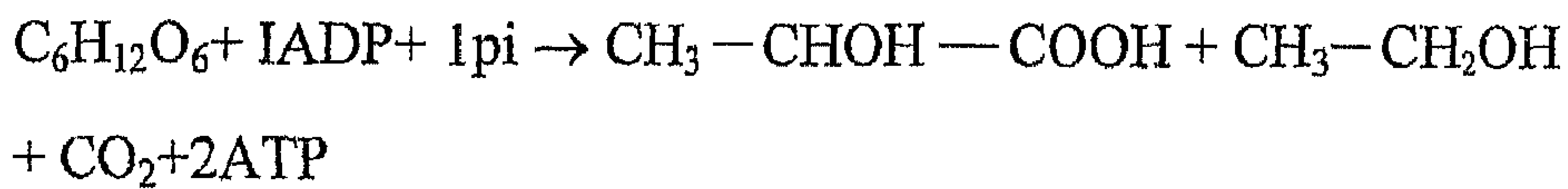
اللاكتك اعتمادا على الوسط الزرعي. أما في عضلات الحيوانات فإن الايزومر المتكون يكون Lactate dehydrogenase الموجود في اللبائن إلى خمسة ايزوانزيمات تحفز جميعها تفاعلا كيمائيا واحدا إلا أنها تختلف في خصائصها الحركية.

ب- الاختمار اللاكتيكي متغاير التخمر:

مثل في هذا النوع من الإختمار إضافة إلى حامض اللاكتك، مركبات أخرى جانبية مثل الإيثانول وحامض الخليك وCO_2 والمانيت Mannit ويقسم على قسمين: الأول ينتج عنه غاز CO_2 والثاني لا يتكون فيه هذا الغاز. يحصل النوع الأول في Lactobacillus

Brevis و Lenconostoc mesenteroides وتمثل المعادلات التالية التفاعل الإجمالي في كل من الكائنين المجهريين:

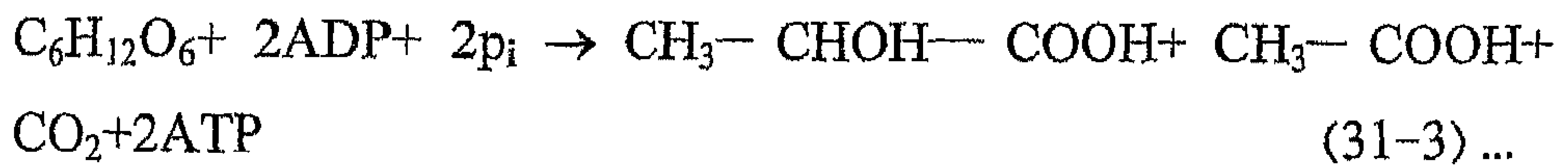
Leuconostoc mesenteroides:



$$C_6H_{12}O_6 + IADP + 1pi \rightarrow CH_3-CHOH-COOH + CH_3-CH_2OH + CO_2 + 2ATP$$

(30-3) ...

Lactobacillus brevis:



$$C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2p_i \rightarrow CH_3-CHOH-COOH + CH_3-COOH + CO_2 + 2ATP$$

(31-3) ...

إن ما يميز الإختمار اللاكتيكي متغاير التخمر هو أن تقويض الكلوكوز يحصل بتكوين phosphogluconic acid-6 بطريقة مشابهة لمسلك فسفات البنتزو وليس عن طريق امدن- مايرهوف- بارناس لتحلل السكر Glycolysis وذلك لإفتقار هذه الأحياء المجهرية إلى أنزيم الالدولاز Aldolase

ويمثل الشكل (3-6) الاختمار اللاكتيكي متغاير التخمر في البكتريا Lactobacillus brevis , Leuconostoc mesenteroides

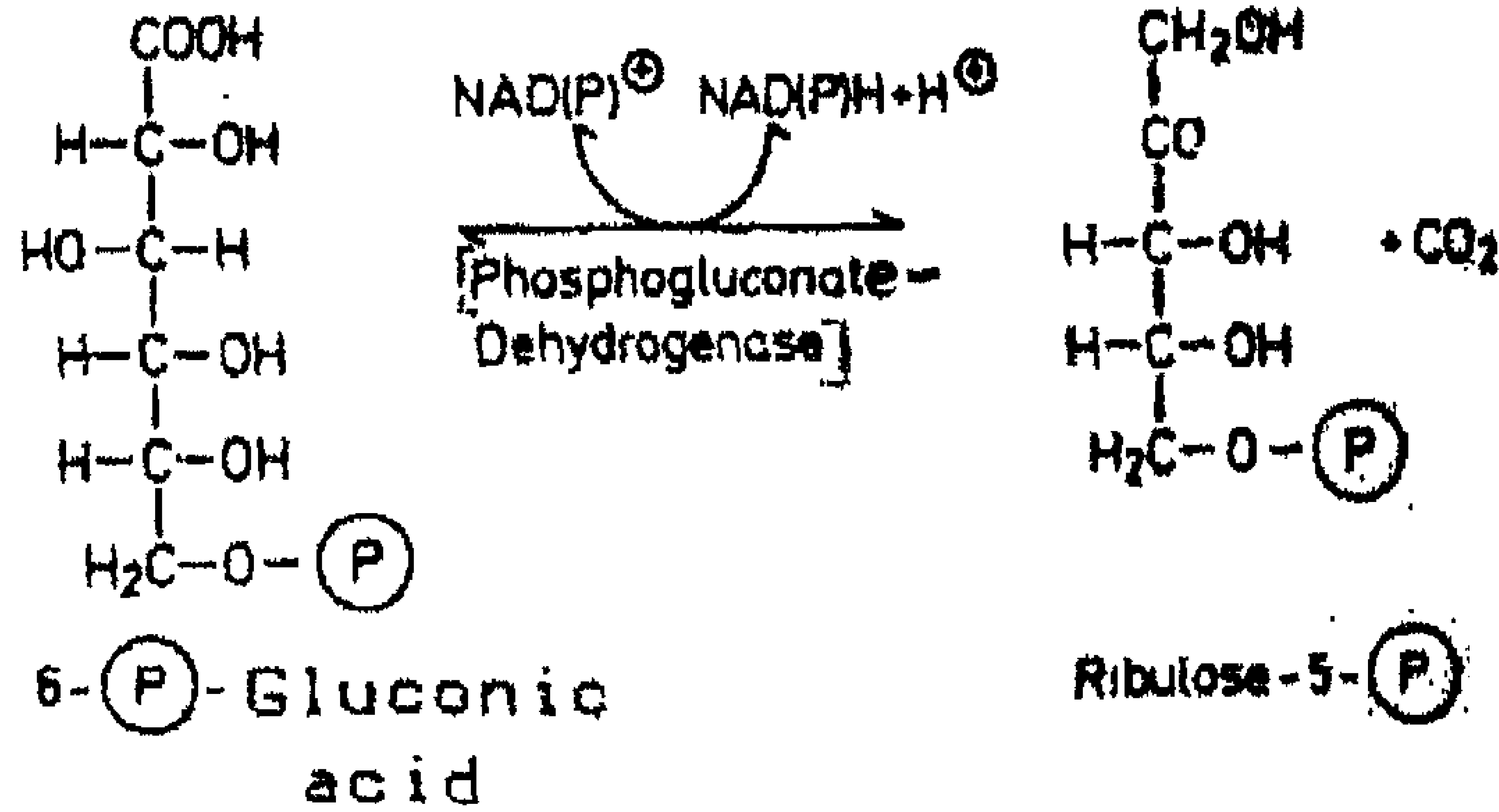
أما خطوات هذا النوع من الإختمار فكما يأتي:

الخطوة الأولى: فسفرة الكلوكوز-6- فسفات بالطريقة المألوفة.

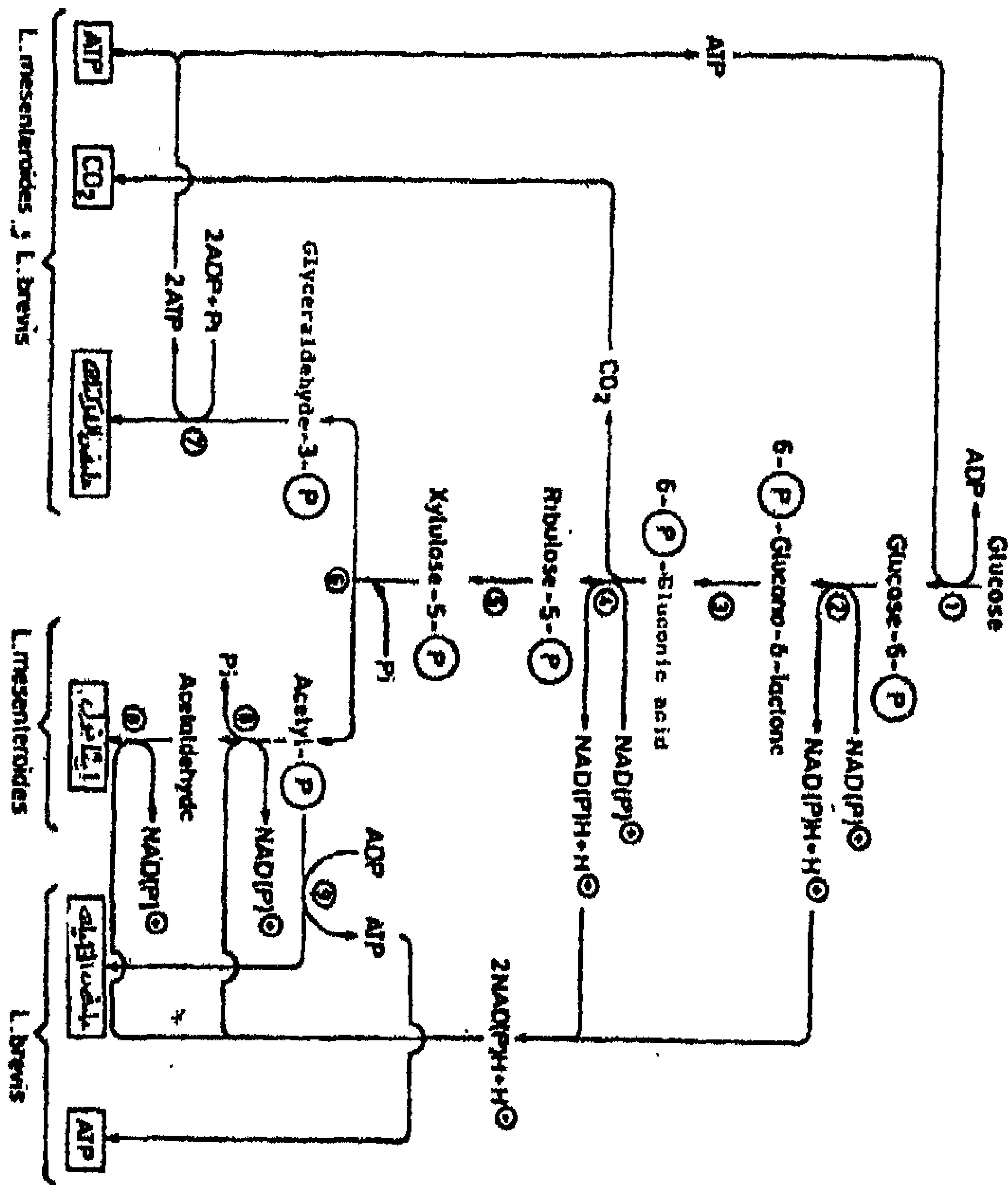
الخطوة الثانية: إزالة الهدروجين من كلوكوز -6- فسفات وتحويله إلى luconolactone 6- phosphog (شكل 2-6 التفاعل الثاني).

الخطوة الثالثة: التحلل المائي للمركب 6 -phosphogluconolactone إلى 6 -phosphogluconicacid إن هذه الخطوة متماثلة مع **الخطوة الثالثة** في مسلك KDPG بكل تفاصيلها.

الخطوة الرابعة: وهي الخطوة المميزة لهذا المسلك حيث يتحول Conic acid6-phosphoglu - إلى phosphate - 5 - Ribulose بإزالة الكاربوكسيل بالأنزيم 6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)



(32-3) ....



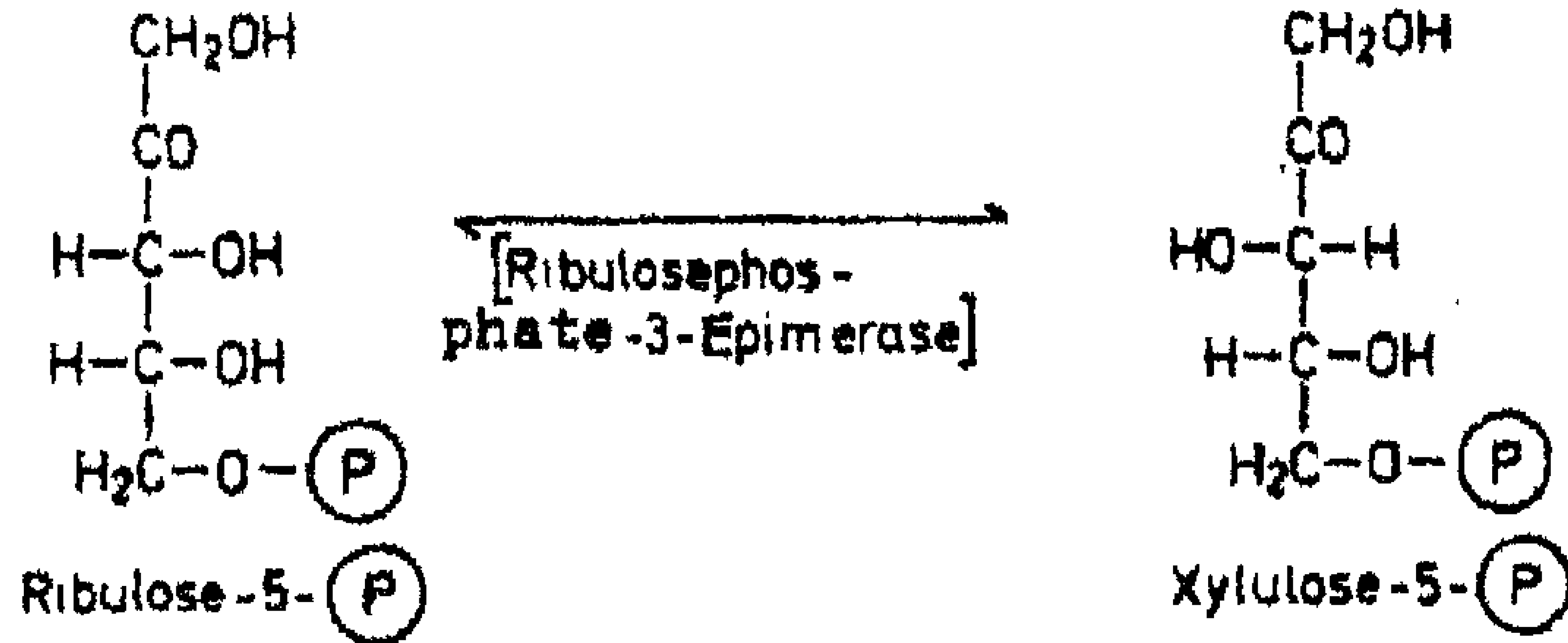
شكل 3-6

وتستخدم مكافئات الإختزال الناتجة في هذه الخطوة في مراحل أخرى تالية في المسلك.

إن الأنـزيم المحفـز للتفاعـل 6-phosphogluconate dehydrogenase والموجود في البكتريا L.mesenteroids يستطيع استخدام NAD^+ حوالي 25 مرة أفضل من $NADP^+$ بينما أنزيمات مصادر أخرى تستطيع استخدام $NADP^+$ فقط.

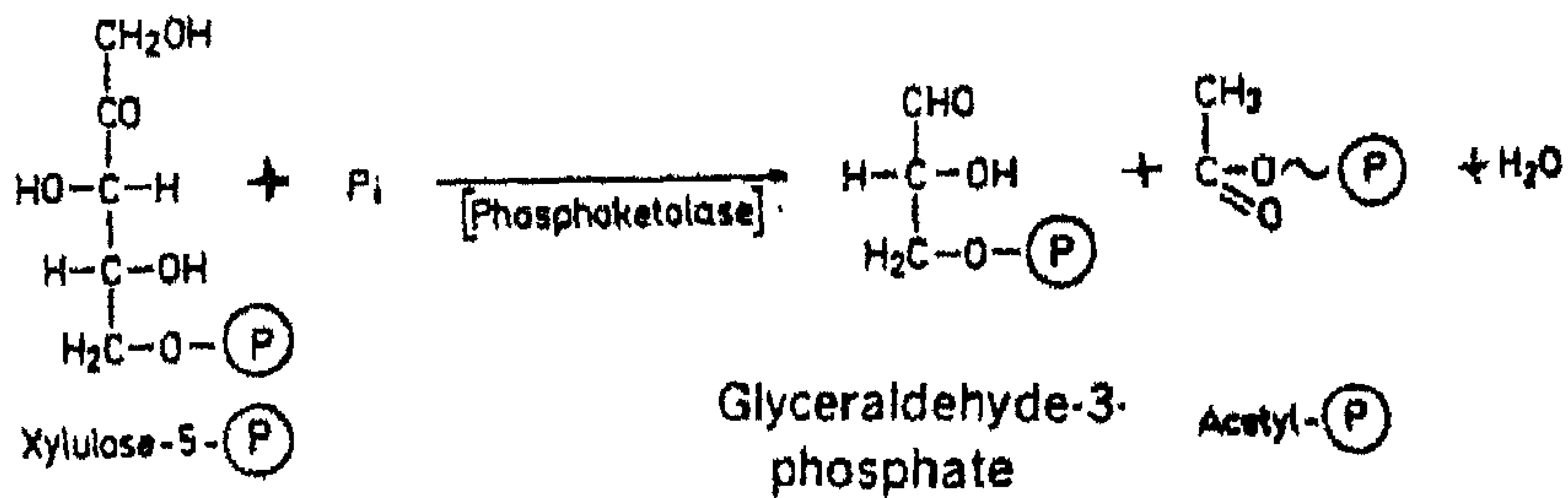
تتخصص جميع هذه الأنزيمات 6-phosphogluconate dehydrogenase تخصصا شديدا للركيزة 6-phosphogluconate

الخطـوة الخامسـة: يتحـول المركـب Ribulose -phosphate-5 إلى 5-Xylulose Phosphate- بواسطة الأنزيم Ribulose phosphate -3-epimerase وهـذا الأنـزيم شـديد التخـصص للركيـزة ولا يعمـل علـى المركـب، .diphosphate Ribulose -1.5-



(33-3) ....

الخطوة السادسة: وتتم بوجود الأنزيم phosphoketolase والفسفات اللاعضوية وينتج عن التفاعل Glyceraldehyde 3-phosphate و Acetyl phosphate



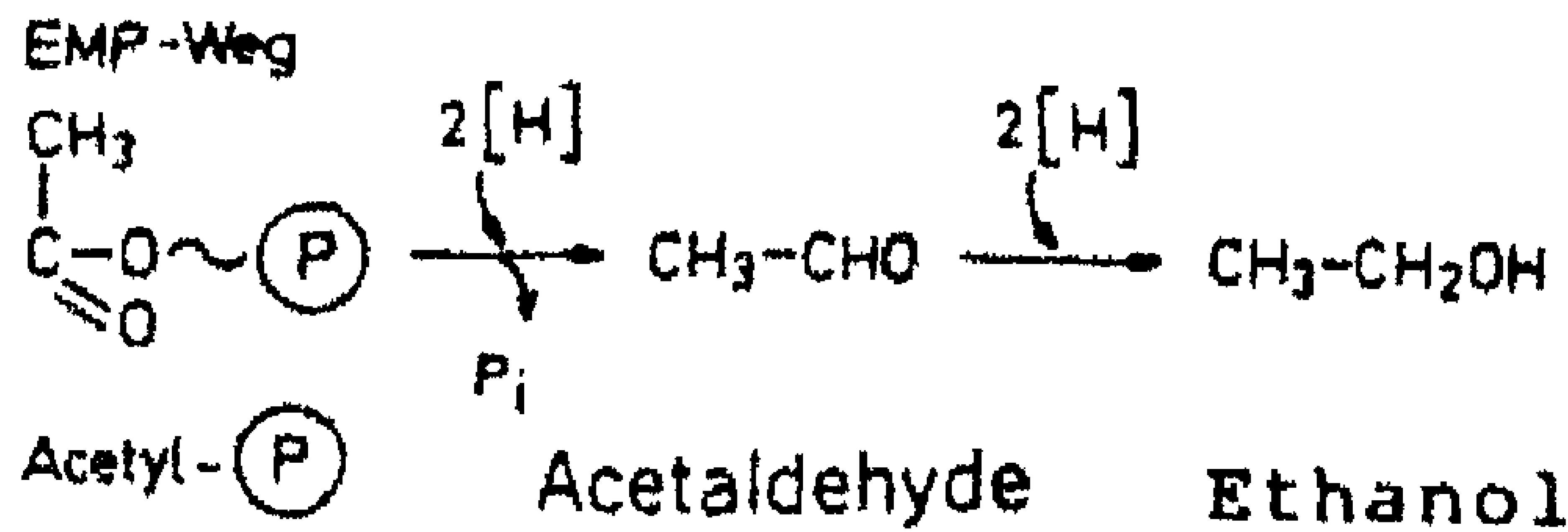
(34 -3) ....

إن المركـب Acetyl Phosphate عـالي الطاقـة ويمـكـن خـزن هـذه الطاقـة في تفاعـل لاحـق بـشـكل ATP أي بالفـسفرة علـى مـستوى الركيـزة كمـا في البكتريا L.brevis (شكل 3-6).

يمكن لأنزيم phosphoketolase الموجود في البكتريا L.mesenteroides إن يستخدم المركبات Fructose -6-phosphate و Hydroxy pyruvate بمثابة ركائز إضافة إلى Xylulose -5-phosphate كما يمكن استعاضة الفسفات بالارسنات Arsenate.

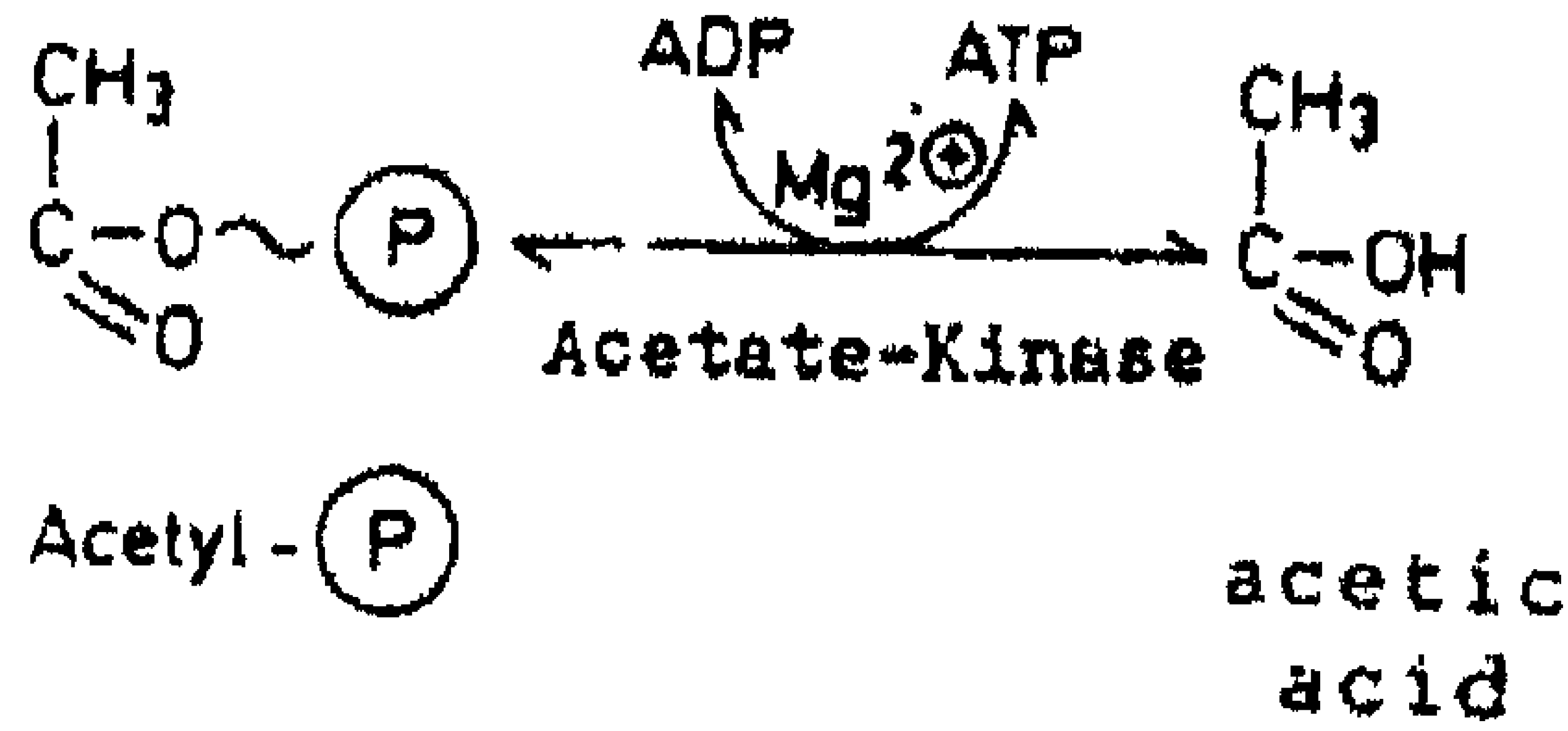
الخطوة السابعة: يتحول الكلسرالدهيد-3- فسفات إلى حامض اللاكتك بالتفاعلات المعروفة في مسلك EMP ويستخدم جزء من الطاقة الناتجة (انظر الشكل 3-3) لفسفرة الكلوكوز.

الخطوة الثامنة: يتم اختزال المركب Acetylphosphate- بعد انفصال الفسفات اللاعضوية منه- إلى الاستالدهيد ثم إلى الإيثانول ويستخدم لهذا الغرض مكافئات الاختزال الناتجة عن أكسدة كلوكوز-6- فسفات و6- فسفوكلوكونات phos—phoglvconate6 وحيث لا تتوافر مكافئات الإختزال عند اختمار السكريات خماسية الكربون، يتراكم حامض الخليك ولا تتوافر معلومات كافية حاليا عن الأنزيمات التي تشارك في اختزال Acetyl-p إلى الإيثانول.



(35-3) ....

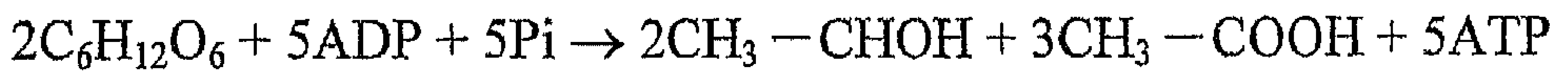
الخطوة التاسعة: تتم هذه الخطوة في البكتريا Lactobacillus brevis إذ تنتقل الطاقة العالية للمركب Acetyl Phosphate بواسطة الأنزيم Acetate Kinase إلى المركب ADP وبذلك يتكون المركب ATP بالفسفرة على مستوى الركيزة:



(36-3) ....

نلاحظ إذن بأنه في الإختمار اللاكتيكي متغاير التخمر الذي يحصل في L.brevis، يمكن الحصول على ربح مضاعف من الATP عند المقارنة بما يحصل في L.mesenteroides إضافة إلى ذلك لا تستخدم جميع مكافئات الإختزال وبذلك يمكن استغلالها لإختزال الكلوكوز إلى المانيت Mannite الذي يتم بتحول الكلوكوز إلى المانوز أولا بفعل أنزيم ايزومراز ثم إختزال مجموعة الالدهيد في المانوز إلى كحول في المانيت ($C^1H_2OH.....C_6H_2OH$).

أما الإختمار اللاكيتكي متغاير التخمر الذي لا ينتج عنه غاز CO_2 فيحصل في البكتريا اللاهوائية Lactobacillus bifidus وتوضح المعادلة الإجمالية التالية مجرى هذا التخمر.

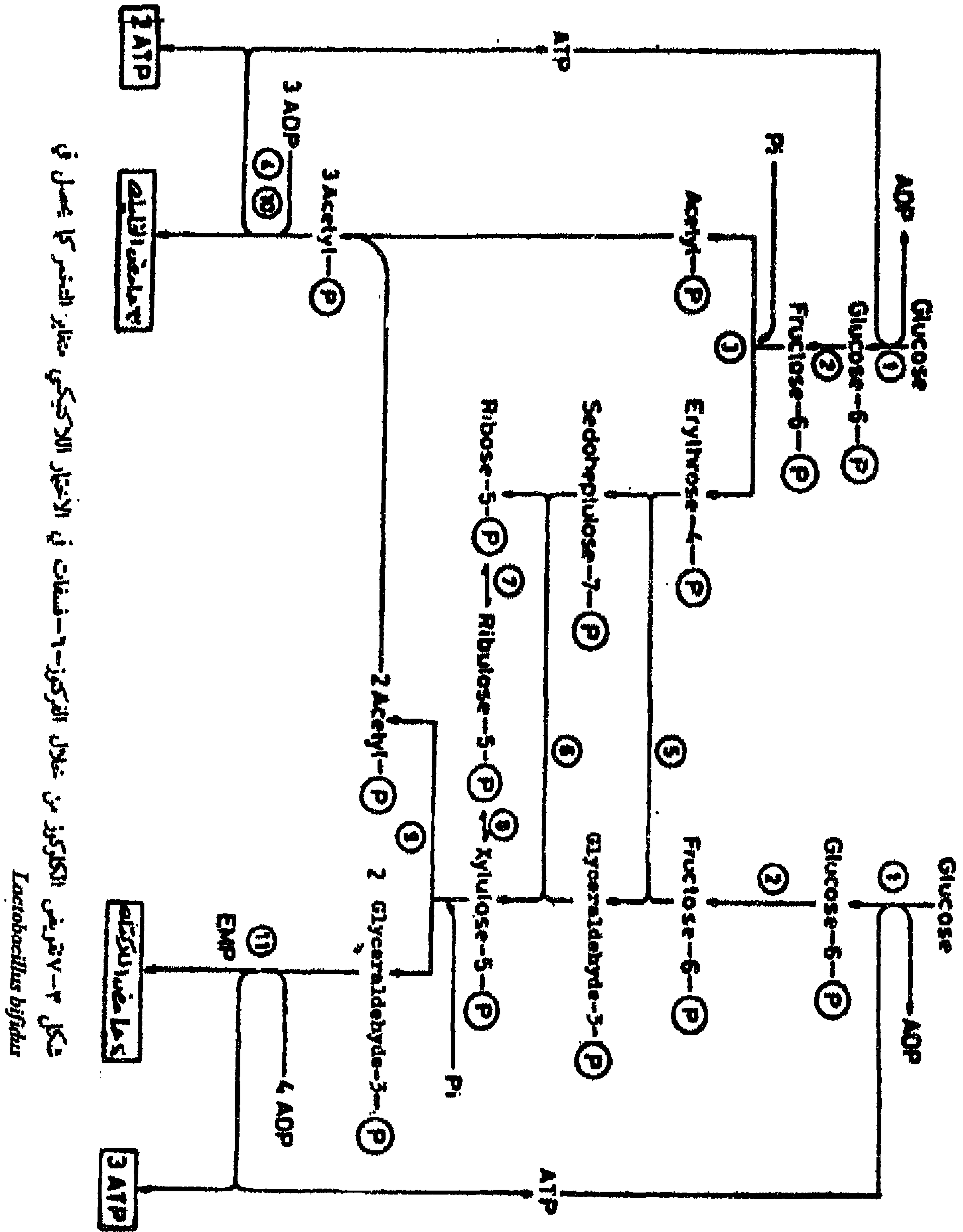


$$2C_6H_{12}O_6 + 5ADP + 5Pi \rightarrow 2CH_3-CHOH + 3CH_3-COOH + 5ATP$$

(37-3) ....

يخمر هذا النوع من البكتريا الكلوكوز عبر المركب فركتوز -6- فسفات كما في الشكل (3-7)، إلا أنه لا يمكن تحول الفركتوز إلى فركتوز-1، 6- ثنائي الفسفات كما يحصل في مسلك EMPلإفتقار هذه البكتريا للأنزيم Phosphofructo kinase وعلى الرغم من احتوائها أنزيم

الالـدولاز عكـس الأحيـاء المجهريـة الأخـرى في الإختمـار اللاكتيكـي متغـاير التخمر. وفيما يأتي تفاصيل التفاعلات الوسطية للتقويض:

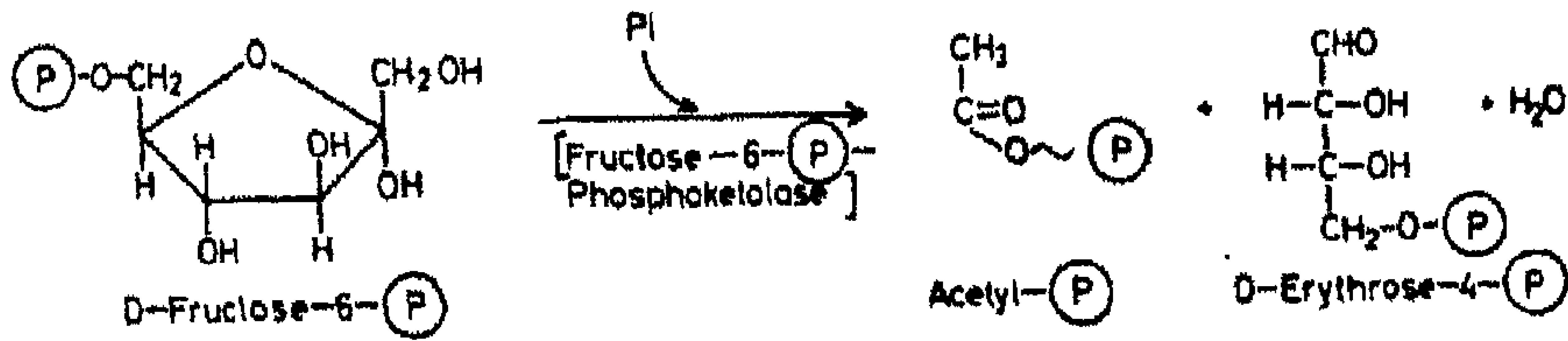


شكل ٣-٧ تقويض الكلوكوز من خلال الفركتوز-٦-فسفات في الاختمار اللاكتيكي متغاير التخمر كما يعمل في *Lactobacillus bifidus*

الخطوة الأولى: تحويل الكلوكوز إلى كلوكوز-6- فسفات كما في مسلك EMP.

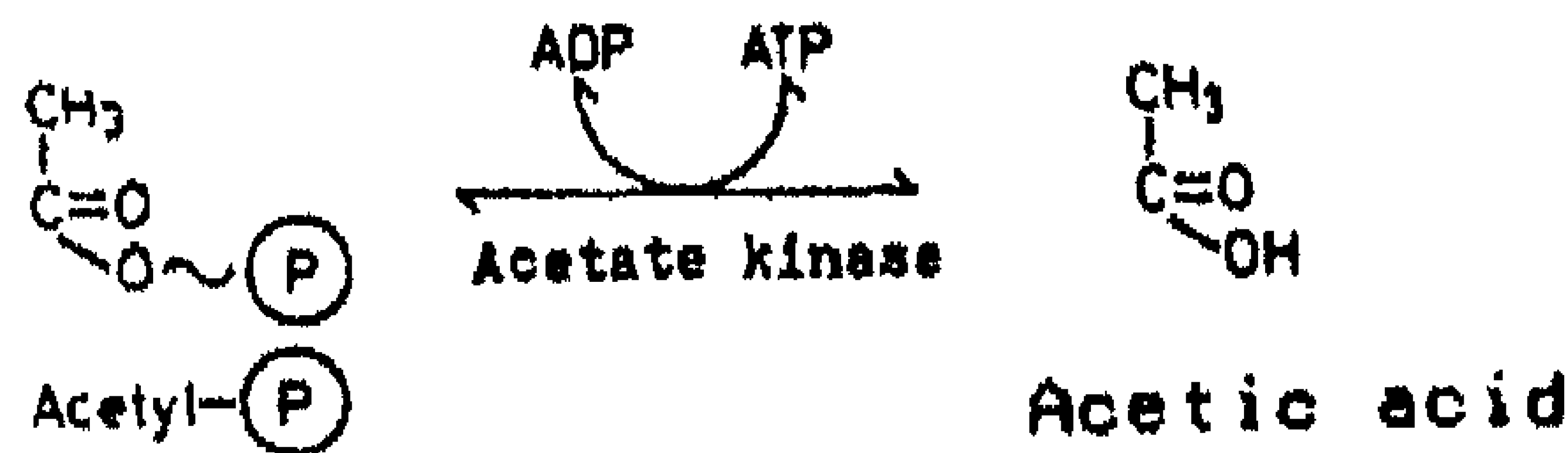
الخطوة الثانية: تحويل كلوكوز-6- فسفات إلى فركتوز-6- فسفات كما في مسلك EMP.

الخطوة الثالثة: وتعد خطوة مميزة للمسلك يتم فيها تحول جزيئة فركتوز - 6- فسفات بواسطة الأنزيم Fructose-6- phospho ketolase وبوجود الفسفات اللاعضوية Pi إلى D-Erythrose-4-phosphate , Acetylyphosphate



(38-3) ....

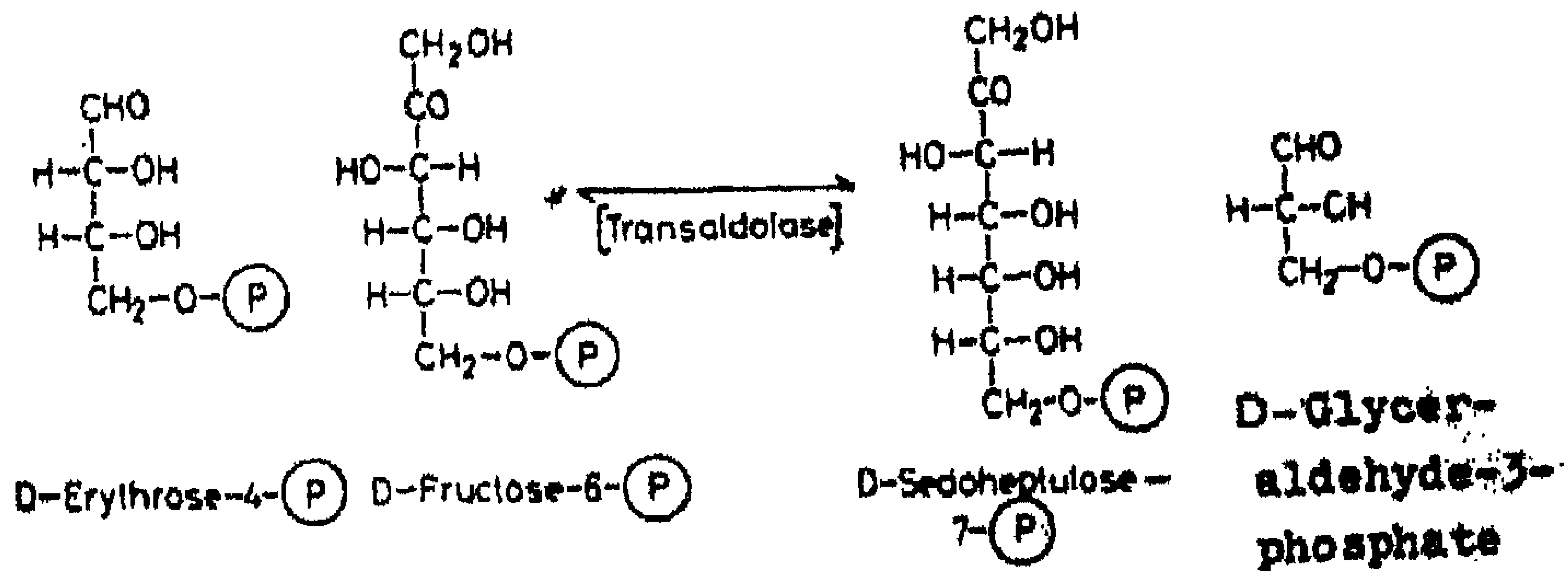
الخطوة الرابعة: يحفز الأنزيم Acetate-kinase تكوين جزيئة ATP من المركب Acetylphosphate الذي يتحول بدوره إلى حامض الخليك بوصفه ناتجا نهائيا للاختمار:



(39-3) ....

الخطوة الخامسة: تتفاعل جزيئة Erythrose-4-phosphate ناتجة عن الخطوة الثالثة مع جزيئة فركتوز-6- فسفات بفعل الأنزيم Transaldolase

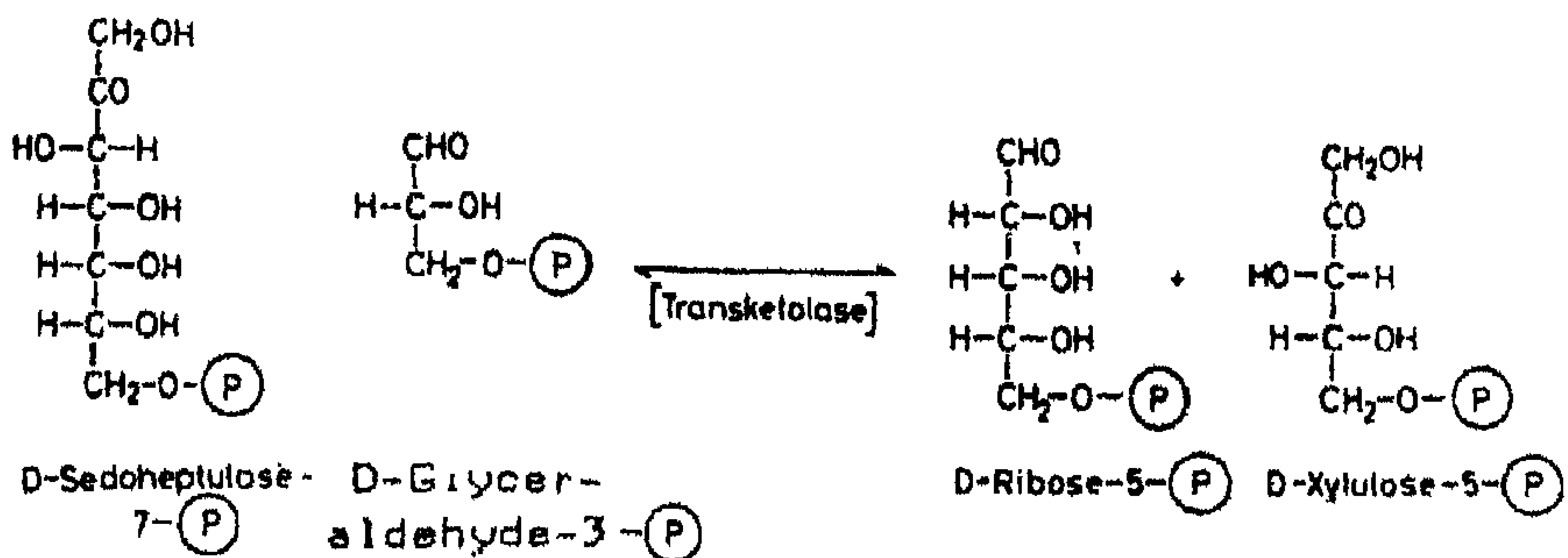
لتكوين دي- كلسر الدهيد-3-فسفات وD-Sedoheptulose -7-phosphate إذ يتم نقل جزء ثنائي هدروكسيل الاستون من الفركتوز-6- فسفات إلى المركب ارثروز-4- فسفات:



(40-3) ....

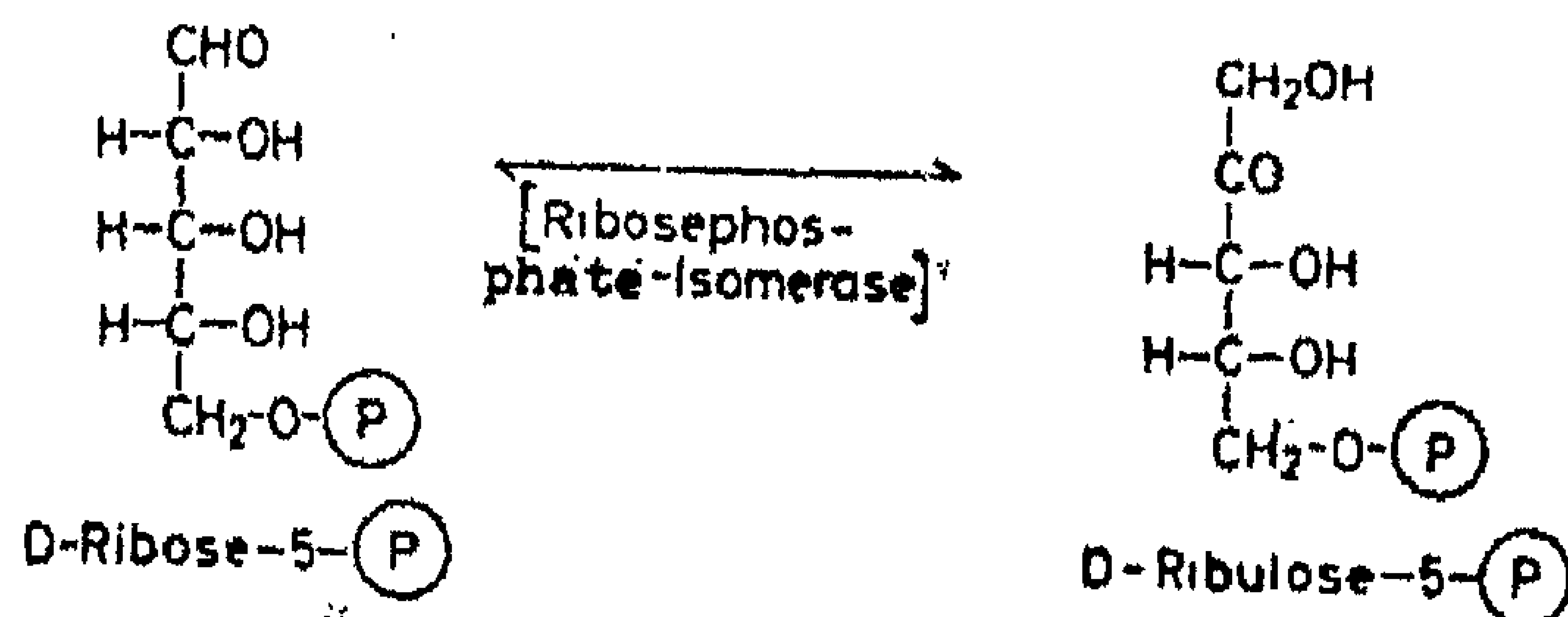
تمثل هذه الخطوة مقطعا من مسلك فسفات البنتوز Pentose-phosphate Pathway كما هي الحالة مع الخطوة السادسة.

الخطوة السادسة: يقوم الأنزيم Transketolase بنقل جزء كلايكول الدهيد Glycolaldehye من جزيئة Sedoheptulose-7-phosphate إلى جزيئة كلسر الدهيد -3- فسفات مؤديا إلى تكوين المركبين D-xylulose-5-phosphate وD-Ribose5- Phosphate.



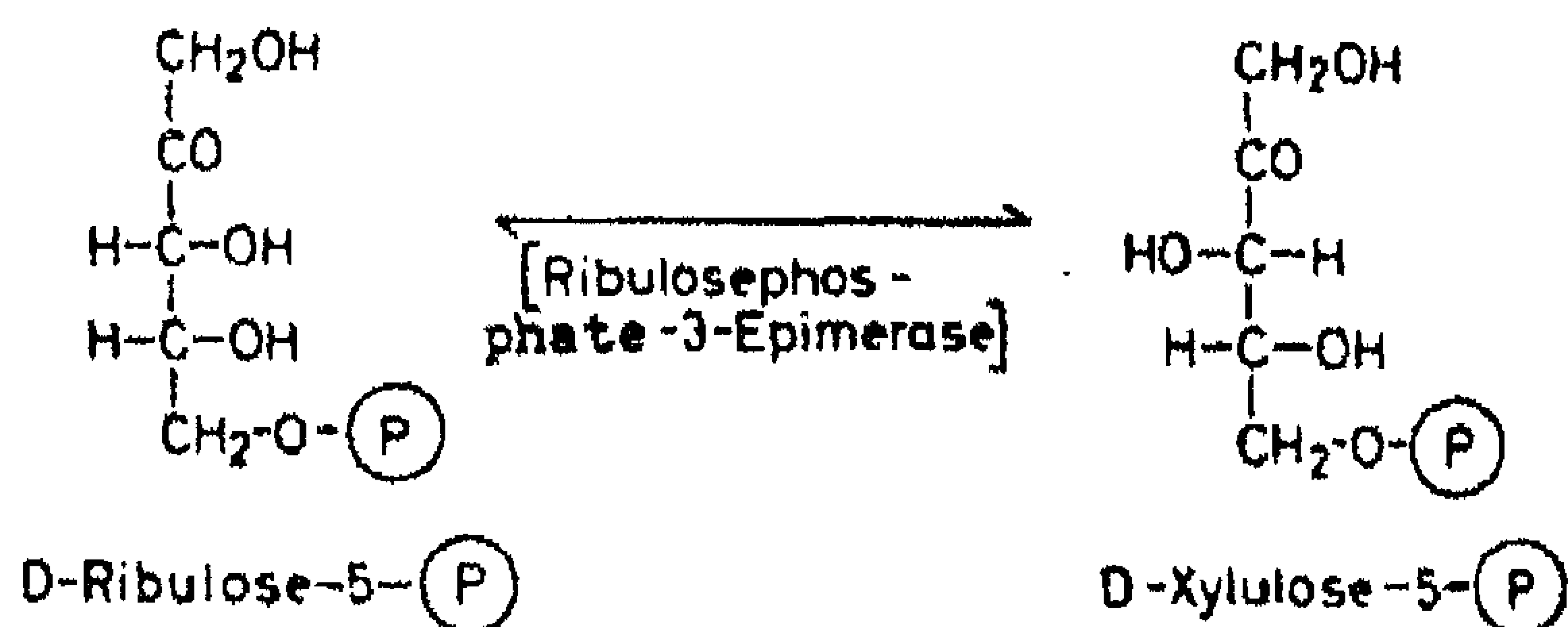
(41-3) ....

الخطوة السابعة: يتحول المركب رايبوز-5- فسفات إلى رايبلوز-5- فسفات بفعل الأنزيم Ribose phosphate isomerase شديد التخصص للركيزة:



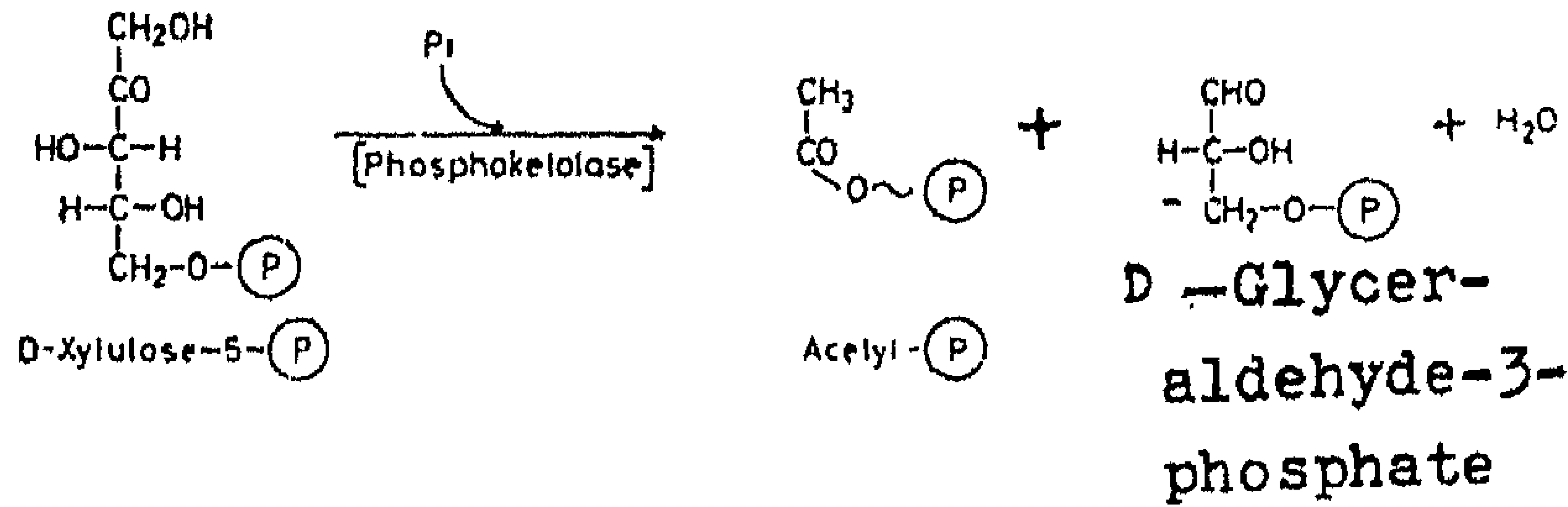
(42-3) ....

الخطوة الثامنة: يحفز الأنزيم Ribulose phosphate-3- epimerase- عالي التخصص- تحول رايبلوز-5- فسفات إلى زايليلوز-5- فسفات.



(43-3) ....

الخطوة التاسعة: يتحول زايليلوز-5- فسفات بفعل الأنزيم phosphoketolase إلى كلسر الدهيد- 3- فسفات والمركب عالي الطاقة Acetylphsphate.



(44-3) ....

الخطوة العاشرة: يتحول Acetylphosphate بفعل أنزيم Acetate kinase إلى حامض الخليك مع تحرير جزيئة ATP (التفاعل 10 ، شكل 3-7).

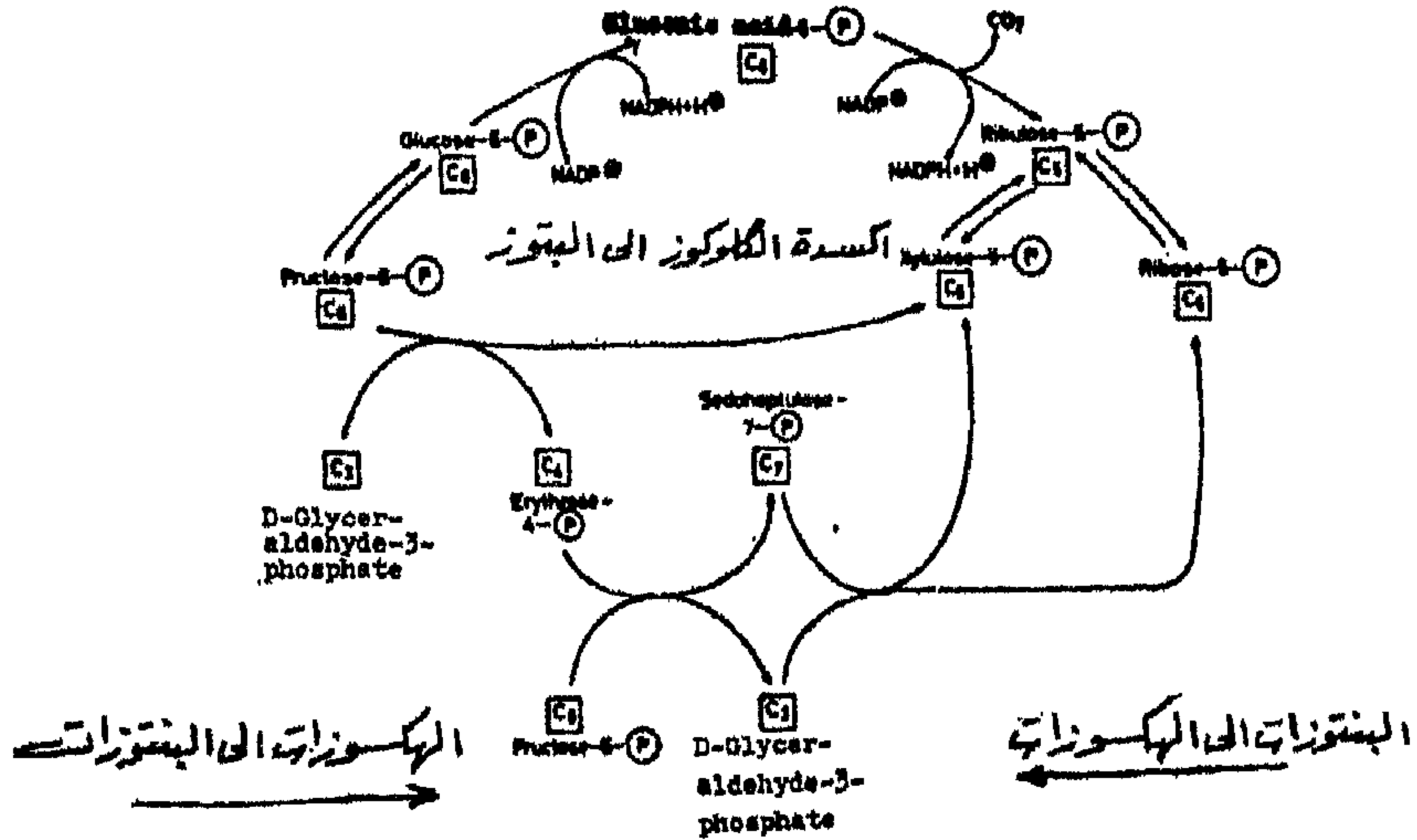
الخطوة الحادية عشرة: يتم الحصول على طاقة إضافية (بشكل ATP عند أكسدة كلسر الدهيد-3- فسفات إلى حامض اللاكتك بمسلك EMP إذ تنتج جزيئتان ATP لكل جزيئة كلسر الدهيد-3- فسفات يمكن تحولها (التفاعل 11 ، شكل 3-7).

إن الطاقة الناتجة عن هذا النوع من الإختمار هي 2.5 جزيئة ATP لكل جزيئة سكر سداسي الكربون وبذلك يكون هذا النوع من الإختمار اكفأ في حفظ الطاقة من مسلك EMP (جزيئتان ATP لكل جزيئة سكر) أو مسلك KDPG (جزيئة ATP لكل جزيئة سكر سداسي الكربون) أو الإختمار اللاكتيكي متغاير التخمر الذي ينتج عنه CO_2 و 1-2 جزيئة ATP لكل جزيئة سكر سداسي الكربون.

وكما ذكرنا سابقا فأن التفاعلات المحفزة بالانزيمين Transaldolase و Transketolase يعدان مقطعين من مسلك فسفات البنتوز (PPP) الذي يدعى أيضاً تقويض Warburg Dickens- Horecker. ينتج من مسلك فسفات البنتوز سكريات فسفات البنتوز اللازمة لتخليق الأحماض النووية ولتجهيز تفاعلات

التخليق بمكافئات الاختزال ولإنتاج جزيئات مستلمة لثاني أوكسيد الكربون (رايبلوز-5- فسفات) في التركيب الضوئي.

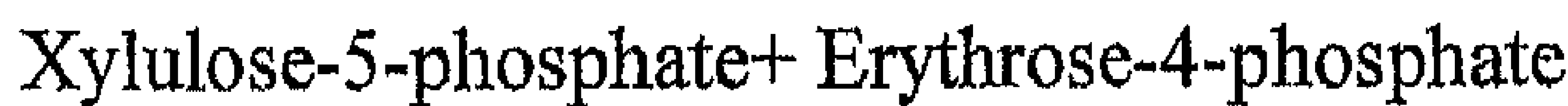
يوضح الشكل (3-8) مسلك فسفات البنتوز.



شكل (3-8) سلك فسفات البنتوز PPP.

يتم في مسلك فسفات البنتوز تحويل الكلوكوز إلى كلوكوز -6- فسفات ثم تحويل الأخير إلى Phosphogluconic acid، وبالتالي تكوين رايبلوز-5- فسفات وزايليوز -5- فسفات بأسلوب مشابه لما ذكر للاختمار اللاكتيكي متغاير التخمر الذي ينتج عنه CO_2 (شكل 3-6، والخطوات 1-5). ثم يتم نقل وحدة ثنائية الكربون ($-CH_2OH-CO$) من الفركتوز-6- فسفات إلى المركب كلسر الدهيد-3- فسفات وبذلك يتكون زايليوز -5- فسفات وارثروز-4- فسفات بفعل الأنزيم Transk-etolase:


Fructose-6- phosphate+ Glyceraldehyde-3-phosphate→


Xylulose-5-phosphate+ Erythrose-4-phosphate

(45-3)

ثم تتوالي تحولات السكريات كالآتي:


Erythrose-4-phosphate+ Fructose-6- phosphate

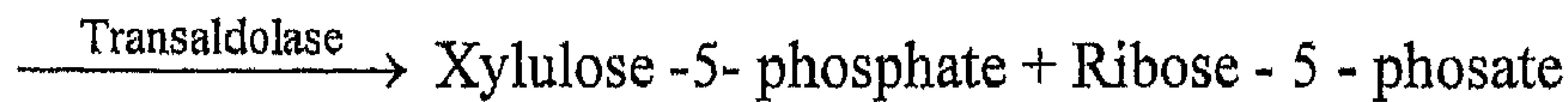
(46-3)


Transaldolase →


Glyceraladehyde-3- phosphate+ Sedoheptulose-7- phosphate


Gluceraldehyde-3- phosphate+ Sedoheptulose-7-phosphate

(47-3)


Transaldolase → Xylulose -5- phosphate + Ribose - 5 - phosate

تماثل المعادلتان (3-46) و (3-47) المعادلتان (3-40) و (3-41) لتقويض الكلوكوز من خلال الفركتوز-6- فسفات في الإختمار اللاكتيكي متغاير التخمر في البكتريا L.bifidus.

ويتضح من الشكل 3-8 بأنه ينتج في مسلك PPP عن جزيئتي سكر سداسي الكربون وجزيئة سكر ثلاثي الكربون، ثلاث جزيئات سكريات خماسية الكربون.

لو أمعنا النظر في الشكل 3-8 لوجدنا بأنه إذا تمت المسلك من اليمين إلى اليسار يتبين التحول الرجوعي Reversible من السكريات خماسية الكربون إلى سداسيتها وعلى العكس فإن قراءة المسلك إلى اليمين يبين تحول السكريات سداسية الكربون إلى خماسيتها وبالحقيقة فإن إنتاج السكريات خماسية الكربون ومكافئات الإختزال يعد أهم نتاج لهذا المسلك.

3-1-1-3 الاختمارات المنتجة للايزوبروبانول، بيوتانول، حامض البيوترك أو الاستون:

التخمرات المنتجة لحامض البيوترك أو الإيزيروبانول أو البيوتانول أو الأستون تحصل عادة في البكتريا اللاهوائية المكونة للسبورات التي تنتمي إلى جنس الكلوستريديوم Clostridium ومنها:

Clostridium butyricum: ولهـا القـدرة علـى تخمـير المركبـات الكربوهيدراتية وتكوين حامض البيوترك.

Clostridium acetobutylicum: تؤدي إلى تخمير السكريات إلى حامض البيوترك ومن تحويله إلى بيوتانول كما تستطيع تكوين الاستون

Clostridium butylicum: ولهـا القـدرة علـى تكـوين الايزبروبـانول Isopropanol يوضـح الجـدول 3-2 نـواتج التخمـر في الظـروف اللاهوائيـة التامـة للأنواع الثلاثة من الكلوستريديوم التي تعد مهمة صناعياً.

جدول 3-2 نواتج الإختمار لثلاثة انواع مهمة صناعيا من الكلوستريديوم مصدر قم (1)

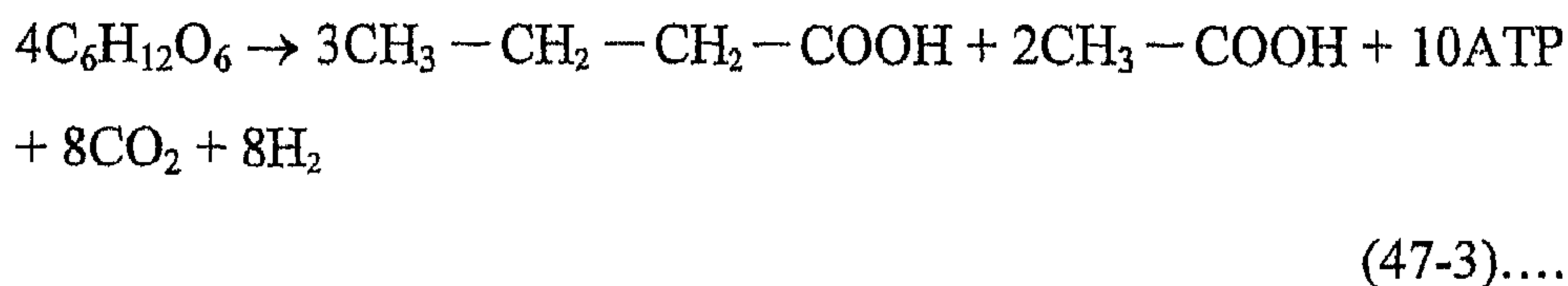
نواتج الإختمار	Cl. butyricum Type:Butyric acid	Cl.acetobutlicum Type: Acetone butanol	Cl.Butyicum Type. Butanol Isopropanol
	ملي مول لكل 100 ملي مول كلوكوز مختمر	ملي مول لكل 100 ملي مول كلوكوز مختمر	ملي مول لكل 100 ملي مول كلوكوز مختمر
حامض البيوترك	76	4	17
حامض الخليك	42	14	17
ايثانول	–	7	–
بيوتانول	–	56	59
اسيتون	–	22	–
ايزوبروبانول	–	–	12
استيوئين Acetoin	–	6	–
CO_2	188	221	204
هدروجين	235	135	78

نواتج الإختمار	Cl. butyricum Type:Butyric acid	Cl.acetobutlicum Type: Acetone butanol	Cl.Butyicum Type. Butanol Isopropanol
الكربون الكلي ٪	96	100	96

للاختمار المنتج لحامض البيوترك دور مهم في تكنولوجيا الأغذية إذ يعد هذا الاختمار في معامل الأغذية غير مرغوب فيه. إن البكتريا المسؤولة عن هذا الإختمار تكون سبورات مقاومة نسبيا لحرارة التعقيم كما تحوي أنزيمات اميلاز فعالة جدا تحلل المواد الغذائية الحاوية على النشا، إن تلوث المنتجات الغذائية أو المواد الأولية بهذه الأنواع من البكتريا يؤدي إلى ظهور رائحة حامض البيوترك كما يحصل لمنتجات الحليب الملوثة بها.

على عكس الحالة مع الإختمار المنتج لحامض البيوترك، فإن التخمر المنتج للبيوتانول والاستون مرغوب ومستغل صناعيا في بعض الدول وبصورة خاصة إنتاج البيوتانول بوصفه مذيبا عضويا ذا أهمية كبيرة من الناحية الإقتصادية إذ أن إنتاجه من الأحياء المجهرية ارخص بكثير من إنتاجه بطرق أخرى.

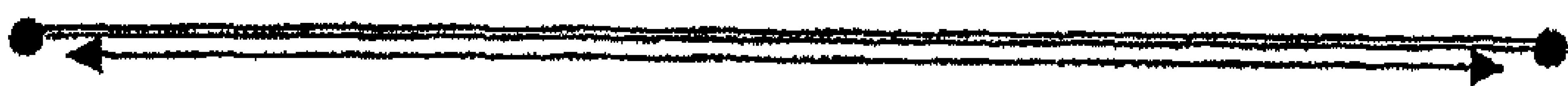
يمكن كتابة المعادلة الإجمالية للاختمار المنتج لحامض البيوترك كما يأتي:



$$4C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_3-CH_2-CH_2-COOH + 2CH_3-COOH + 10ATP + 8CO_2 + 8H_2$$

(47-3)....

ويوضح الشكل 3-9 مخطط لتفاعلات التخمرات المنتجة لحامض البيوترك والاستون الايزوبروبانول والبيوتانول.



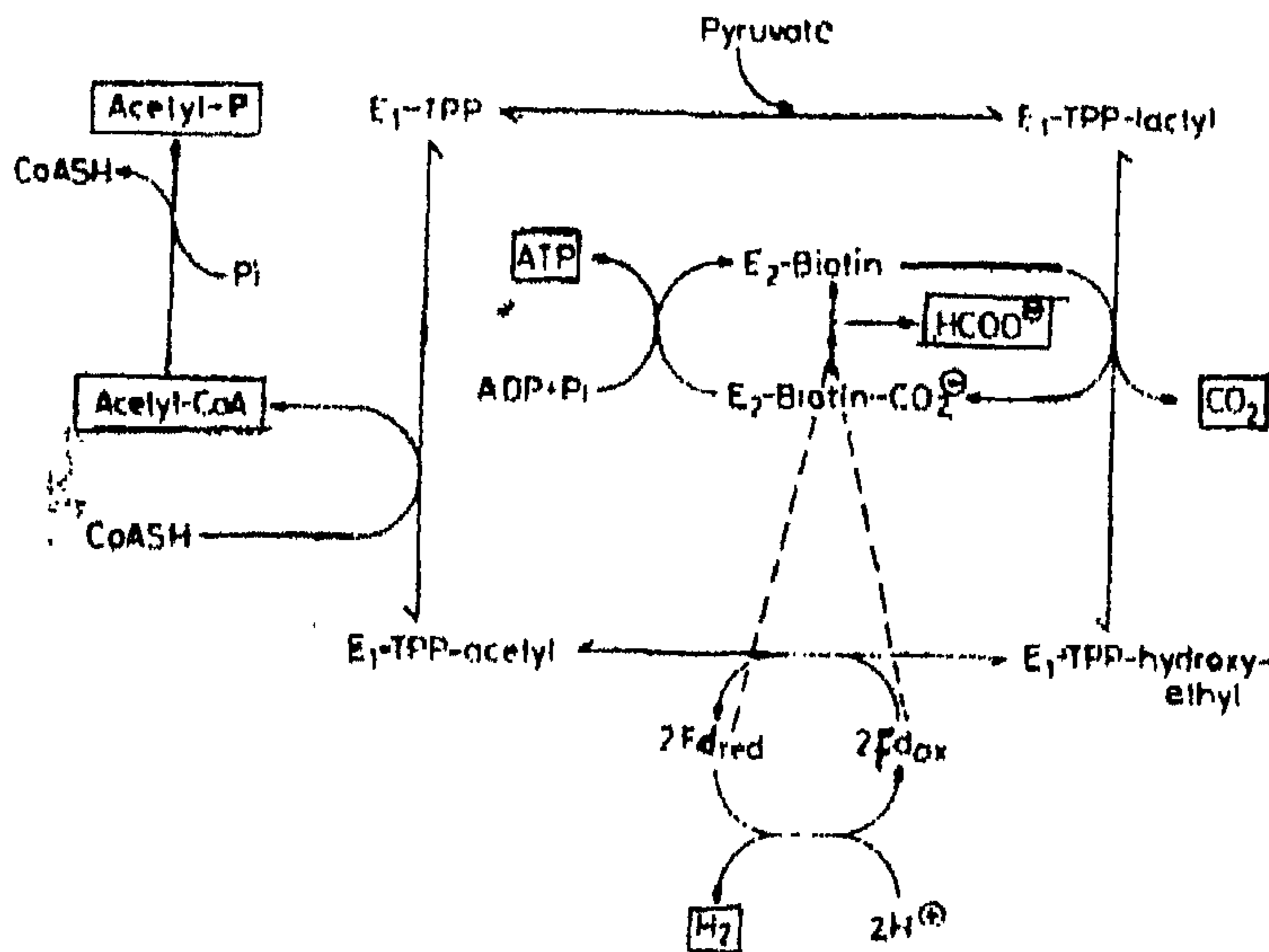
شكل (3-9) مخطط يوضح تكوين البيوتانول والأيزوبروبانول والأستون وحامض البيوترك في بعض أنواع الكلوستريديوم Clostridium.

أما التفاعلات الوسطية لهذه التخمرات فكما يأتي:

الخطوة الأولى: يتضح من الشكل 3-9 بأن الخطوة الأولى- وهي تحول السكر سداسي الكربون إلى جزيئتين حامض البيروفك مع إنتاج جزيئتين ATP- مماثلة لما يحصل في مسلك EMP لتحلل السكر Glycolyis.

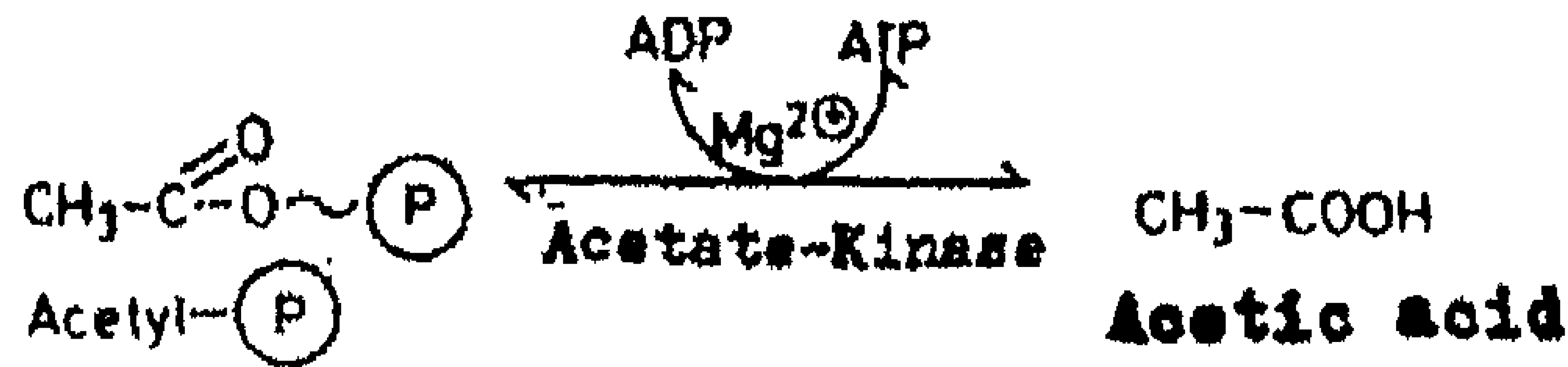
الخطوة الثانية: وتدعى الانشطار المحفز ويحصل التفاعل بوجود التميم الأنزيمي ثيامين بيروفسفات Thiamine pyrophosphate, TPP إذ يتكون معقد ثلاثي من الإنزيم والتميم والركيزة E_1-TPP-lactyl وهذا يتحول بدوره إلى E_1-TPP-hydroxyethyl بعد عملية إزالة الكربوكسيل ويتأكسد المعقد الأخير

بواسطة المركب Ferredoxin (بروتين حاو على الحديد ويبلغ وزنه الجزيئي 5500 وذ جهد اختزال قيمته- 0.425 فولت) إلى E1-TPP- acetyl وبذلك فإن ال Ferridoxin يتحول من الشكل المؤكسد ED (ox) إلى الشكل المختزل Fd (red) ويقوم الأخير بدوره بتحويل البروتونات المتحررة نتيجة لأكسدة E_1- TPP- hydroxyethyl إلى E_1-TPP-acetyl إلى جزيئات هدروجين. يقوم تميم الأنزيم Coenzyme AA بمثابة مستقبل لمجموعة الاستيل وبذلك يتكون المركب Acety/CoAمع تحرير E_1-TPP (شكل 3-10).



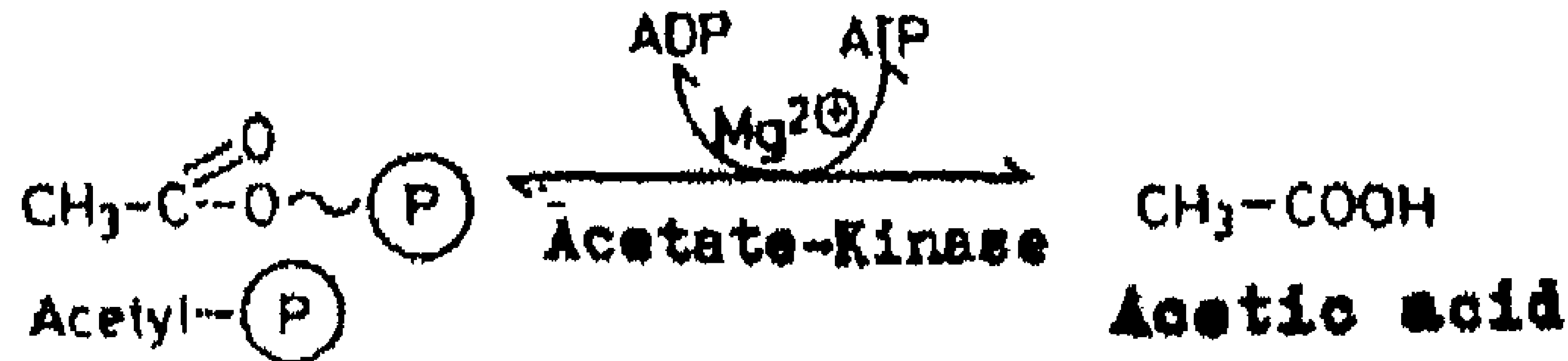
شكل (3-10) نتائج الإنشطار المحفز لحامض البيروفك في بعض أنوات الكلوستريديوم Clostridium.

الخطوة الثالثة: يقوم الأنزيم acetyltransferase phosphate بتحويل المركب CoA Acetyl إلى phosphate Acetyl ويسمى التفاعل: التحفيز الفسفوري.



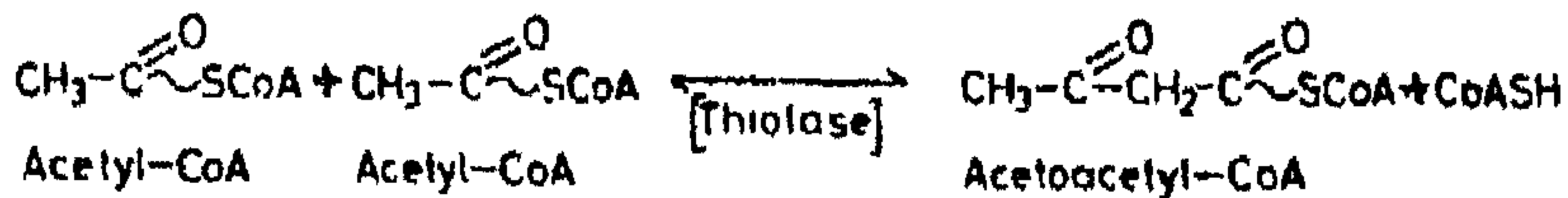
(48-3) ...

الخطوة الرابعة: ويتم فيها إنتاج طاقة بشكل ATP إضافة إلى تكوين حامض الخليك وذلك بفعل الأنزيم Acetate kinase:



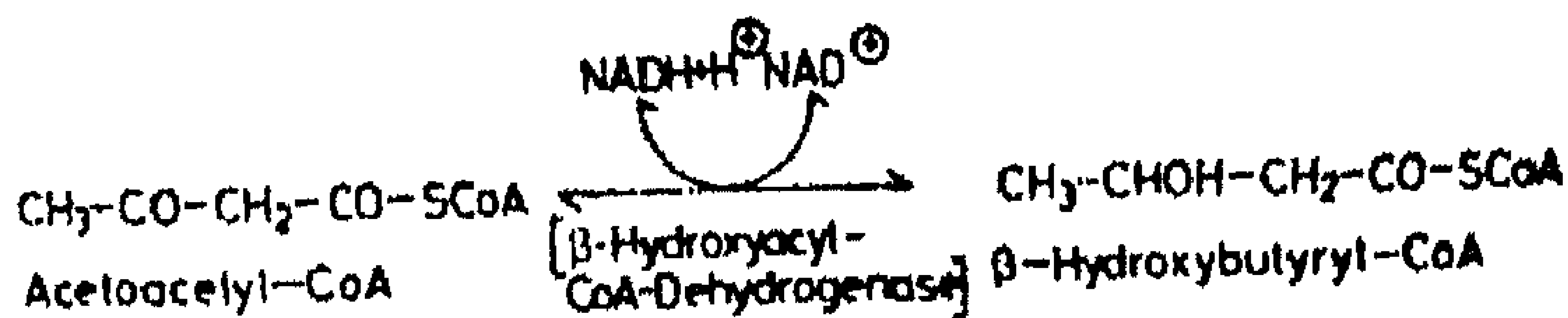
(49-3) ...

الخطوة الخامسة: تتكاثف معظم جزيئات حامض الخليك النشط CoA Acetyly إلى حامض الاستواستك Acetoacetic acid بوجود الأنزيم Thiolase Acetyl CoA Acetyl trans ferase المتخصص للركيزة Acetoacetyl CoA:



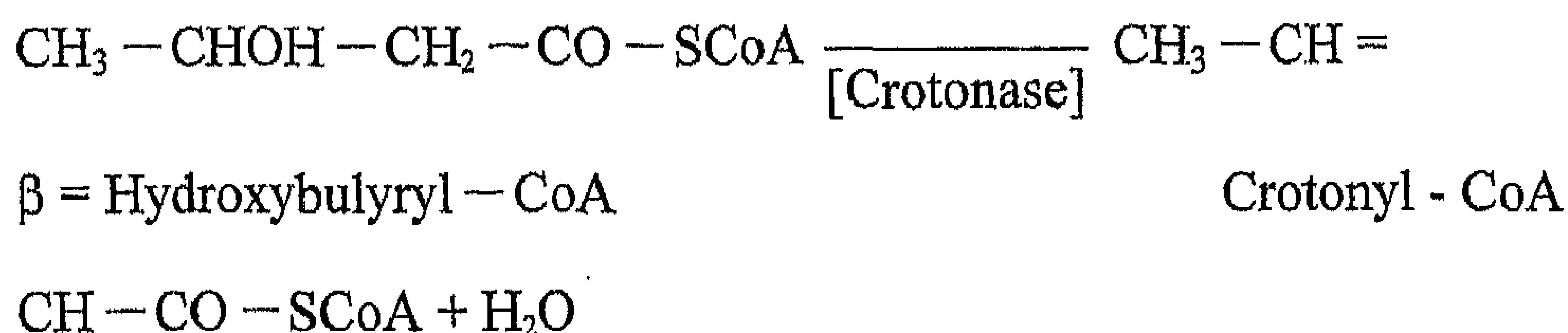
(50-3) ...

الخطوة السادسة: يتحول Acetoacetyl CoA إلى B-Hydroxybutryl بواسطة الأنزيم B- Hydroxyacyl CoA dehydrogenase علما بأن هذا الأنزيم يعمل على جميع المركبات Acyl- CoA المتكونة من 4 إلى 14 ذرة كربون وبالسرعة نفسها.



(51-3) ...

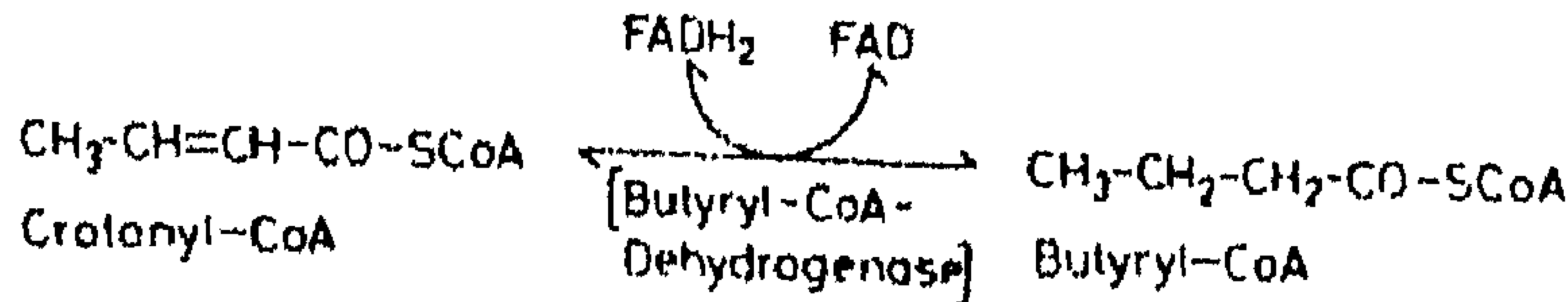
الخطوة السابعة: تزال جزيئة ماء من المركب B-Hydroxy butyryl بواسطة الأنزيم Hydro-lyaseL-3- Hydroxyacyl CoA Enoy CoA hydratase ويدعى كذلك Crotonase:



(52-3)...

إضافة إلى فعله التحفيزي بإزالة مكونات الماء من الركيزة، يعمل الأنزيم Crotonaseكذلك في تحويل مركب إلى زميره Isomerase أو التحويل الرجوعي بين الشاكلين D وL للركيزة Racemaze أبو بوصفه انزيما فاصلا Thioltrans- Crotonylase وهذا يعني بأن الأنزيم ذو تخصص واطيء.

الخطوة الثامنة: يختزل المركب Crotonyl CoA إلى Butyryl CoA بواسطة الأنزيم Butyrl CoA dehydrogenase Butyryl CoA: acceptor- oxidoreductase والانزيم الانزيمي للتفاعل FAD.

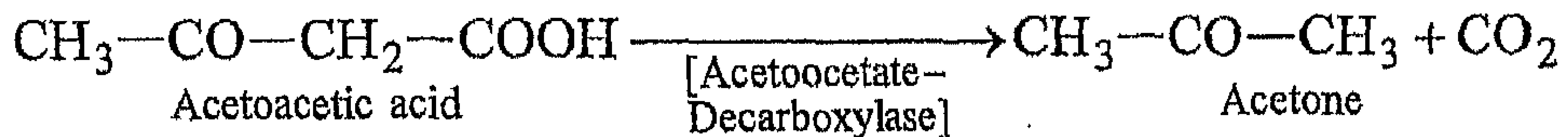


(53-3) ...

الخطوة التاسعة: يتحول Butryl CoA إلى حامض البيوترك وذلك بإنفصال CO ASH أو بربطه مع الخلات لتكوين Acetyl CoA (شكل 3-9، التفاعل 9).

الخطـوة العاشـرة: تحـول Acetoacetyl CoA إلى الحـامض Acetoacetic بأسلوب مماثل للخطوة التاسعة.

الخطوة الحادية عشرة: عند تراكم Acetoacetic acid يحث في البكتريا Cl. Acetobutylicum وCl. Butylicum تكـوين الأنـزيم (Acetoacetate decarboxylase Acetoacetate carboxylyase) الـذي يحـول الركيـزة Acetoaetic acid إلى استون و CO_2.



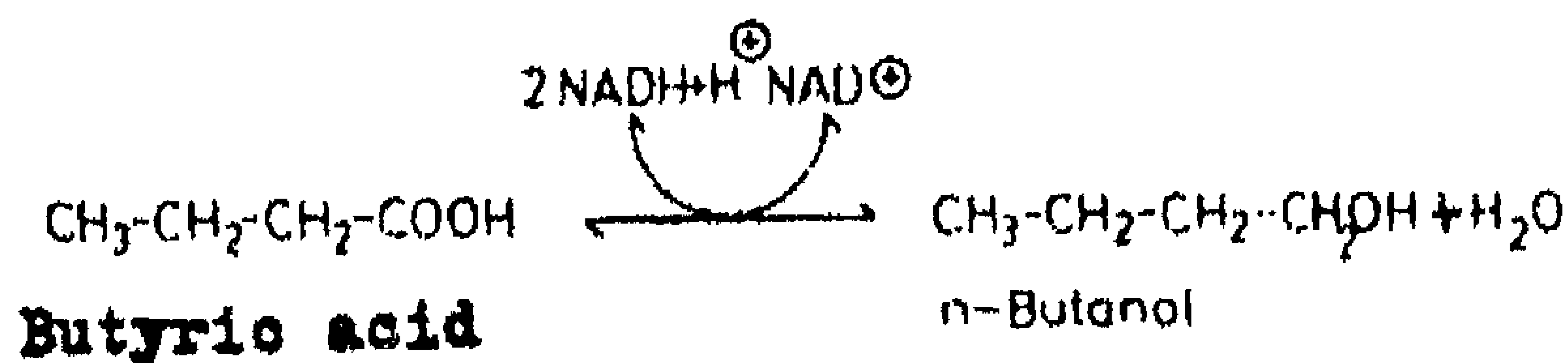
$$CH_3-CO-CH_2-COOH \xrightarrow[\text{[Acetoocetate-Decarboxylase]}]{} CH_3-CO-CH_3 + CO_2$$

Acetoacetic acid — Acetone

(54-3) ...

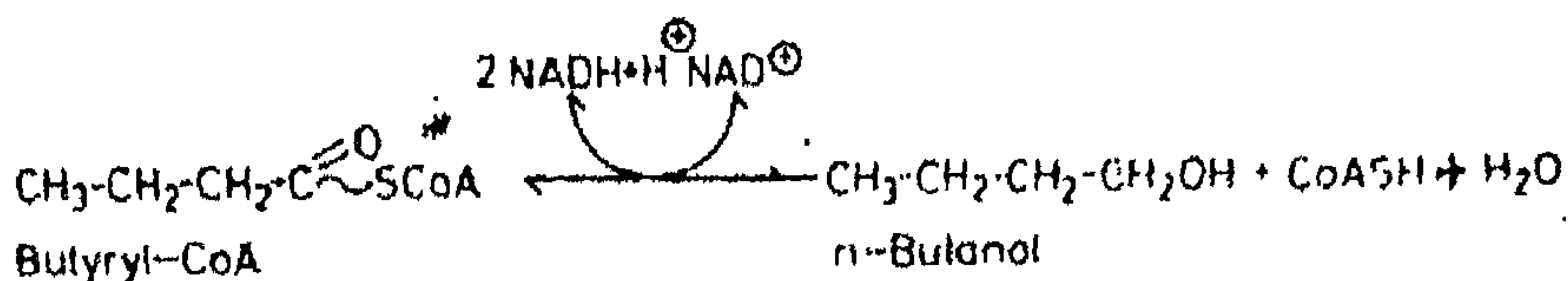
وعنـد حـصول هـذا التفاعـل يحـصل نقـصان شـديد في المركـب Crotonyl CoA (لاحـظ الـشكل 3-9) وبـذلك فـإن مكـافئـات الإختـزال الـتي تـستغل عـادة لإختزال الCoA Crotonyl ، نتيجة لاختزال حـامض البيـوترك و Butyryl CoA كما موضح أدناه.

الخطوة الثانية عشرة: اختزال حامض البيوترك إلى البيوتانول:



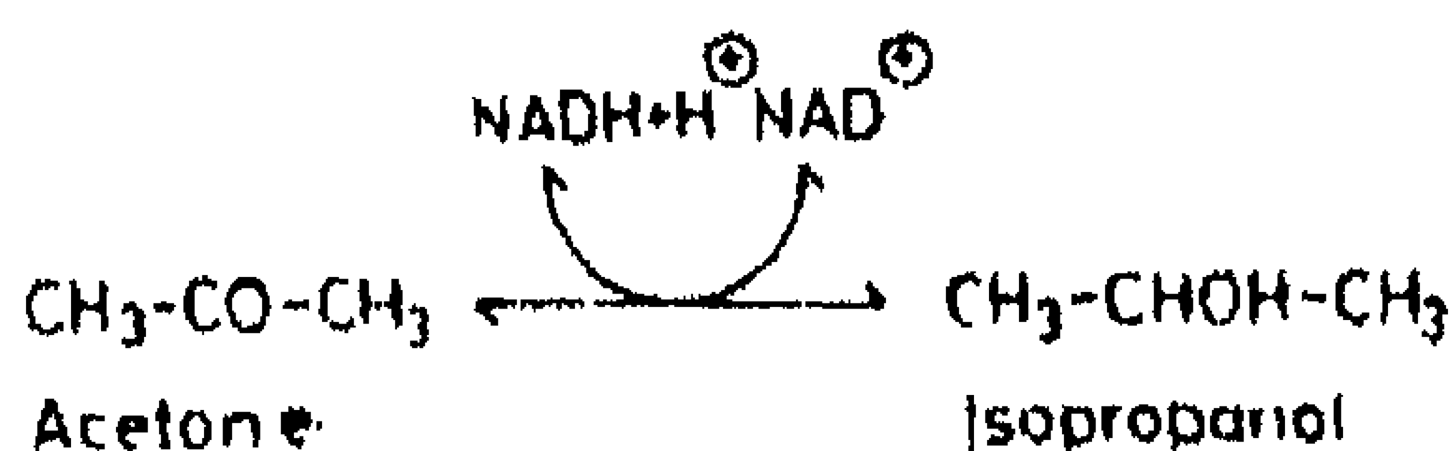
(55-3) ...

الخطوة الثالثة عشرة: اختزال Butyryi CoA إلى البيوتانول:



(56-3) ...

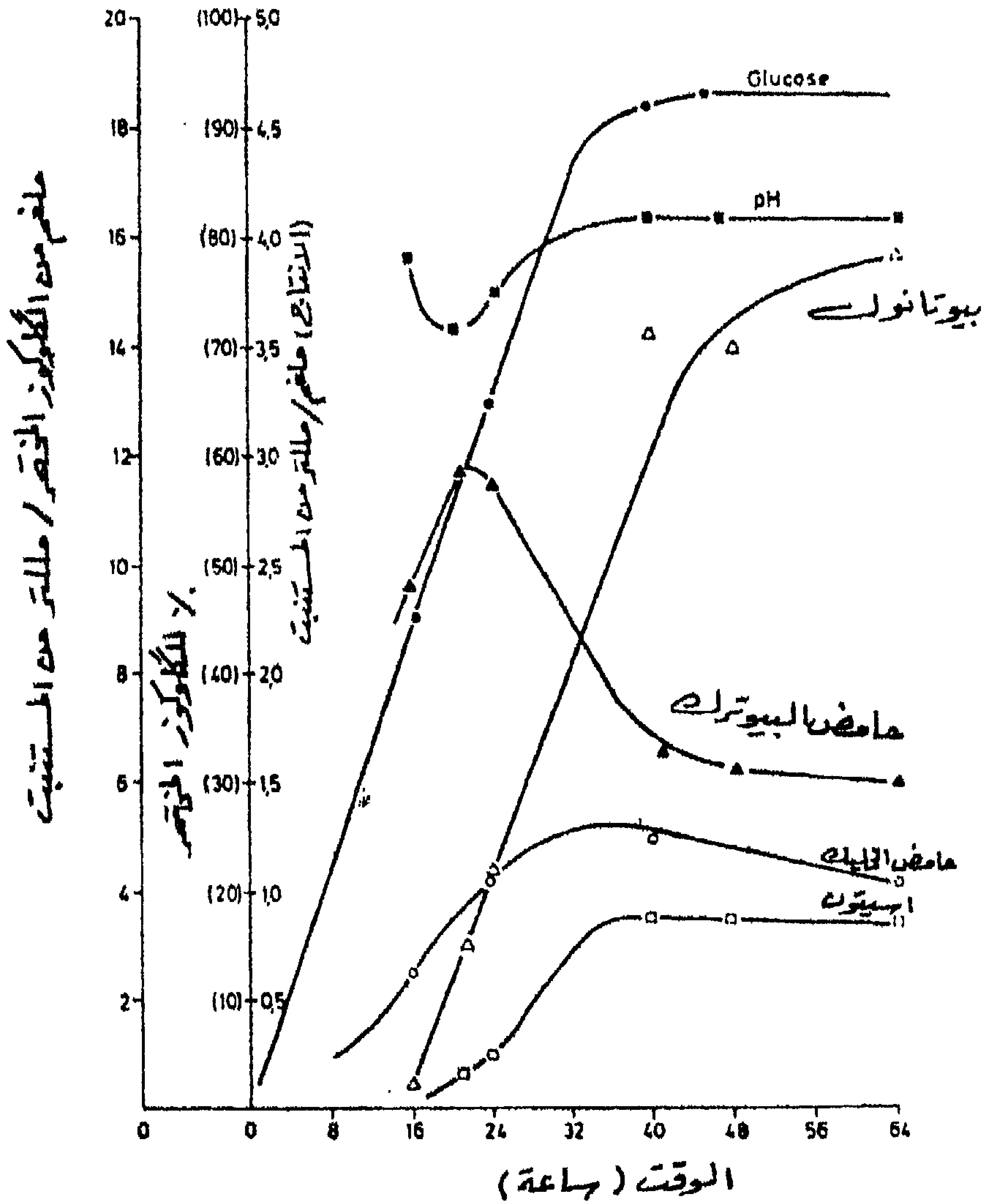
الخطوة الرابعة عشرة: في البكتريا Cl. Butylicum يختزل الاستون إلى ايزوبروبانول.



(57-3) ...

ويمكن توضيح التضاد Antagonism بين إنتاج البيوترك من جهة والبيوتانول والاستون من جهة أخرى بمرور الزمن عند تخمر الكلوكوز بواسطة البكتريا obutylicum Cl. Acet كما في الشكل (3-11). يتضح من الشكل

ازدياد انتاج البيوتانول والاستون مع الزمن وانخفاض انتاج حامض البيوترك نتيجة لحث تخليق الأنزيم Acetoacetate decarboxylase



شكل (3-11) حركيات الاختمار المنتج للبيوتانول والأستون (مصدر رقم 1).

3-1-1-4 الاختمار الحامضي المختلط أو الإختمار الاستوئيني Acetion fermentation

تخمر بعض أنواع البكتريا الكلوكوز بآلية معقدة وتنتج مزيجا من الحوامض كاللاكتك والخليك والفورمك والسكنسك إضافة إلى مواد عضوية أخرى ويوضح الجدول 3-3 التوازن الاختماري لبعض أنواع البكتريا.

جدول 3-3 التوازن الإختماري لبعض أنواع البكتريا

النتائج المقدرة بالملي مول لكل 100 ملي مول كلوكوز مختمر	Escherichia Coli (PH 6.2)	Escherichia Coli (PH 7.8)	Klebsiella aerogenes	Bacillus subtilis	Serration Marcescens
حامض اللاكتيك	79.5	70.0	10.1	17.6	10.1
حامض الخليك	36.5	38.7	51.9	0.2	3.8
حامض الفورميك	2.4	86.0	68.4	1.3	48.2
حامض السكنسك	10.7	14.8	13.1	1.1	8.2
ايثانول	49.8	50.5	51.5	7.7	46.0
كلسيرول	1.4	0.3	4.2	56.8	1.3
استيوئين	0.1	0.2	---	1.5	1.9
3.2 بيوتان داي اول	0.3	0.3	19.2	54.6	64.0
ثاني اوكسيد الكربون	88.0	1.8	79.6	117.8	116.8
الهدروجين	75.0	0.3	---	0.1	0.0
النسبة المئوية للكربون الذي وجد في النواتج	91.2	94.7	95.3	98.0	102.5

مصدر رقم (8)

من النواتج المميزة لهذا الإختمار في البكتريا E.coli حامض الفورمك ويعتمد تكوين هذا الحامض بدرجة كبيرة على الرقم الهدروجيني للمحيط فإذا كان قاعديا تكون حامض الفورميك بكميات كبيرة أما في المحيط الحامضي فيظهر عوضا عن حامض الفورمك، نواتج تحلله وهي CO_2 وهدروجين.

يمكن كتابة المعادلة الإجمالية والمثالية لإختمار الكلوكوز في المحيطين الحامضي والقاعدي كالآتي:

أ. عندما يساوي الرقم الهدروجيني 7.8.

pH 7.8:



$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3 - CHOH - COOH + CH_3^-$

(58-3)....



$COOH + CH_3 - CH_2OH + 2HCOOH + 6ATP$

ب. عندما يساوي الرقم الهيدروجيني 6.2

PH 6.2:



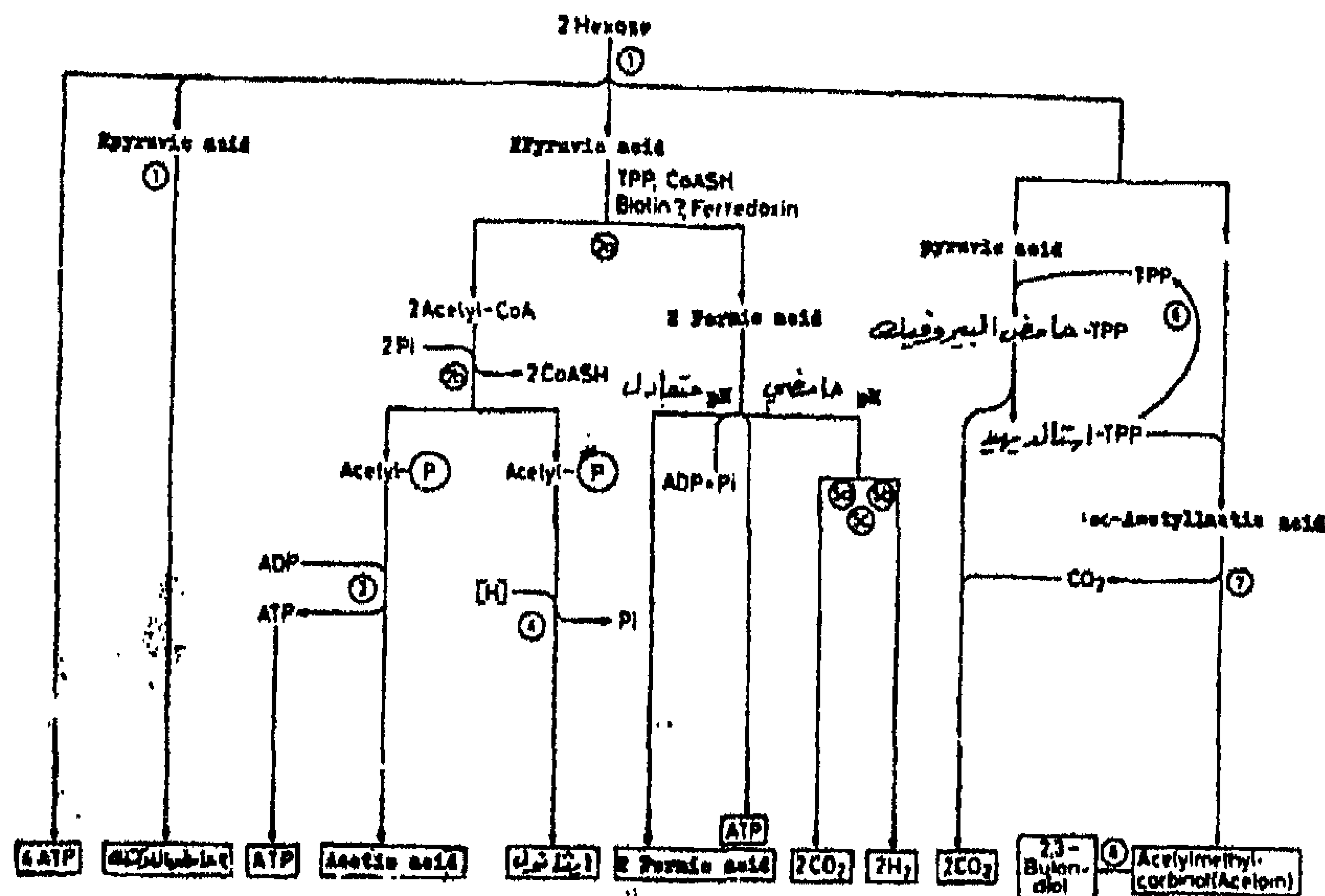
$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3 - CHOH - COOH + CH_3-$

(59-3).....



$COOH + CH_3 - CH_2OH + 2CO_2 + 2H_2 + 6ATP$

يوضح الشكل 3-12 مخطط للاختمار الحامضي المختلط (الاختمار الاستوئيني)



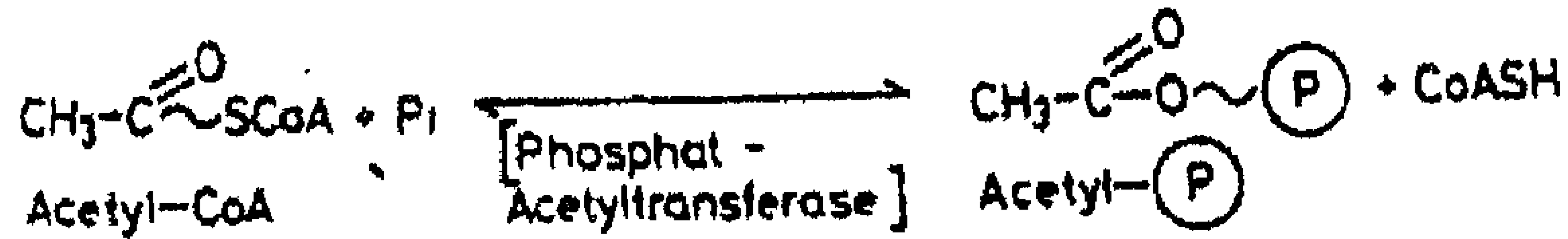
شكل (3-12)

يتضح من المخطط بأن إنتاج حامض اللاكتك يتم بمسلك EMP لتحلل السكر وحيث ينتج 2 مول ATP لكل مول من السكر سداسي الكربون.

إنتاج الاستوئين Acetion أو الأحماض المختلطة الأخرى:

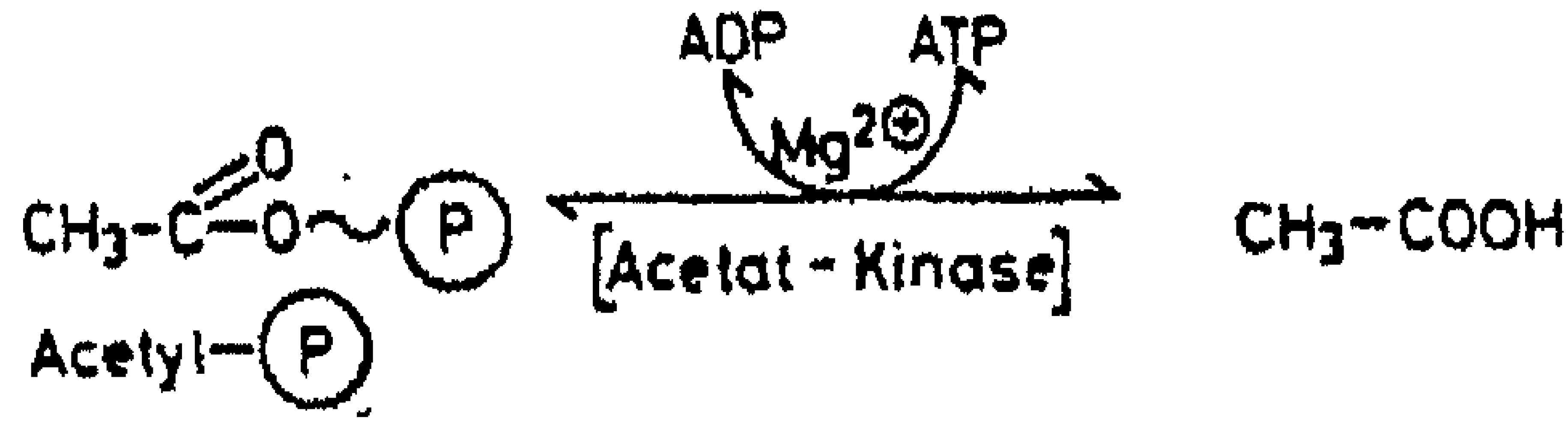
يتم تكوين حاميض الخليك والإيثانول وحامض الفورميك (وكذلك نواتج تحلله CO_2 و H_2) وذلك بالإنشطار المحفز (تفاعل 2a شكل 3-12) ومن الجدير بالذكر، فإن الإنشطار المحفز في الكلوستريديوم يصاحبه انتقال الالكترونات من ال Ferredoxin المختزل إلى البروتونات المنتزعة من الركيزة لتكوين H_2 (شكل 3-10). أما في البكتريا Coliform فأن الالكترونات تنتقل إلى CO_2 لاختزاله ويحتمل إسهام البيوتين بوصفه مستقبلا للمركب CO_2. يتضح من الشكل (3-12) بأن كل جزيئة بيروفات تعطي جزيئة حامض فورمك أو H_2+ CO_2 مع تحرير جزيئة ATP وبذلك تصل عدد جزيئات المركب ATP المتكونة ثلاث لكل جزيئة كلوكوز.

أما المركب Acetyl CoA المتكون نتيجة للإنشطار المحفز فإنه يتحول إلى Acetylphosphate بفعل الأنزيم Phosphate acetyltransferase (تفاعل b2):



(60-3) ...

تنتقل الطاقة العالية من المركب Acetyl Phosphate إلى ADP بواسطة الأنزيم Acetate kinase (التفاعل3، شكل 3-12):



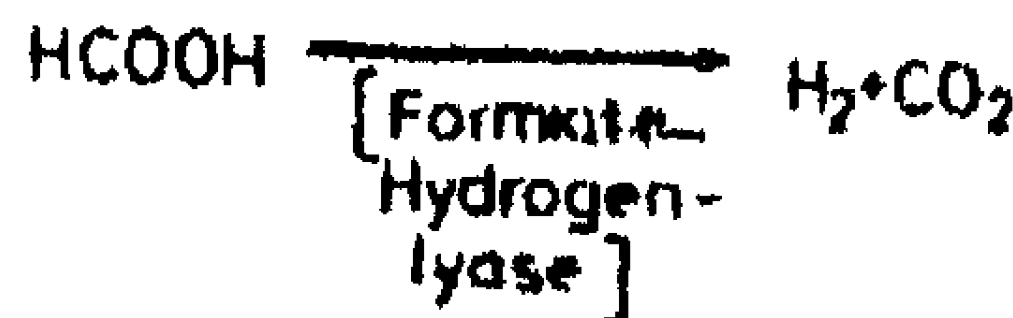
(61-3) ...

وبذلك يتكون حامض الخليك ويكون حصيلة هذا المسلك (كلوكوز إلى حامض الخليك) ثلاثة مول ATP لكل مول من الكلوكوز المختمر. يعتمد إنتاج الإيثانول في البكتريا Coliform على اختزال المركب Acetylphosphate (تفاعل رقم 4 شكل 3-12):



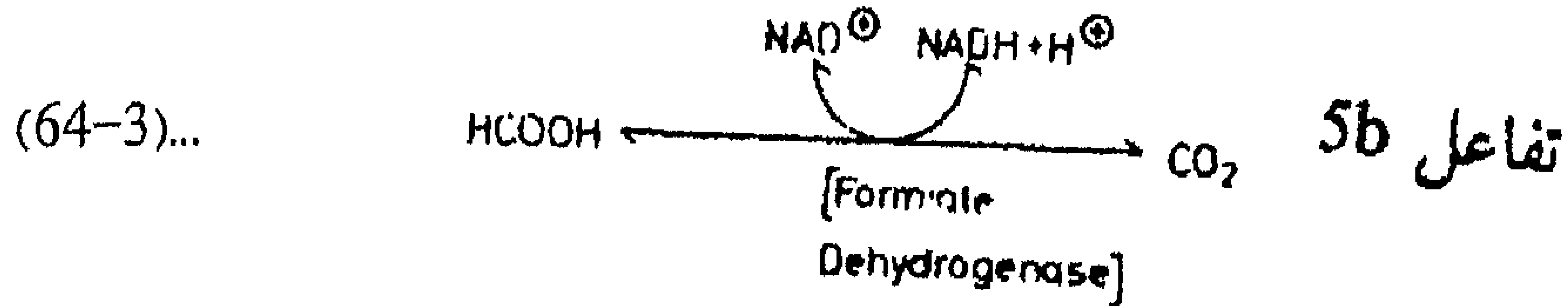
(62-3) ...

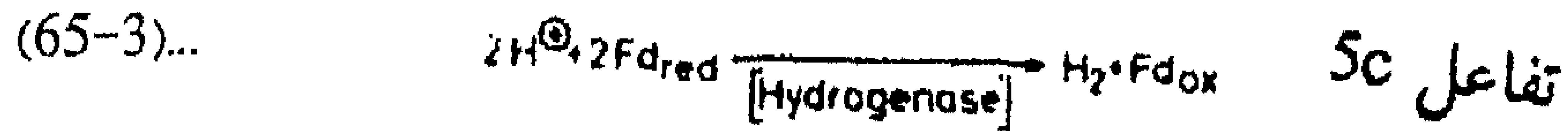
إن المعلومات المتوفرة عن الأنزيمات المسؤولة عن هذا التفاعل قليلة وكذلك الحال مع التفاعلات (5a←) شكل 3-12) ومن المعروف تحول حامض الفورمك إلى CO_2 و H_2 في محيط حامضي ويعتقد بأن الأنزيم Formate hydrogen lyase محفز لهذا التفاعل (تفاعل a5، شكل 3-12):



(63-3) ...

وفي الوقت ذاته يعتقد بوجود تآزر Synergism بين الأنزيمين Formate Dehydrogenase (المحفز للتفاعل 5b) و Hydrogenase (المحفز للتفاعل 5c):

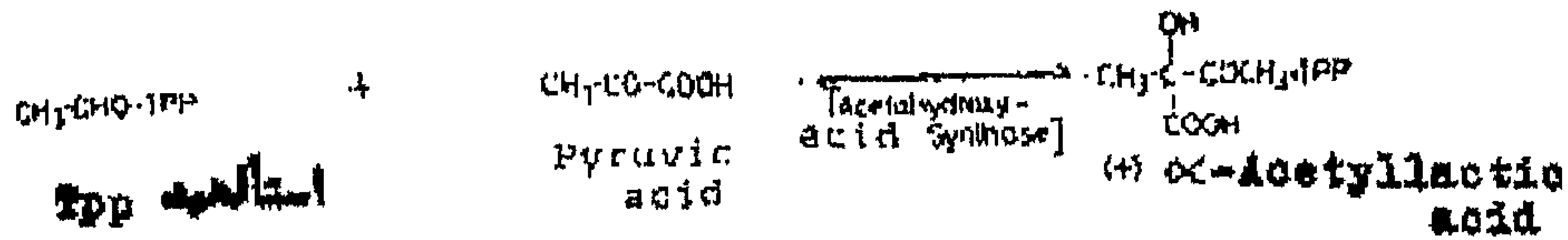




ذكرنا فيما تقدم تكوين حامض الخليك وحامض الفورمك (أو H_2+CO_2) بطريقة الإنشطار المحفز ويتم هذا في البكتريا E.coli كما يرجع إنتاج حامض اللاكتيك فيها جزيئاً بطريقة EMP.

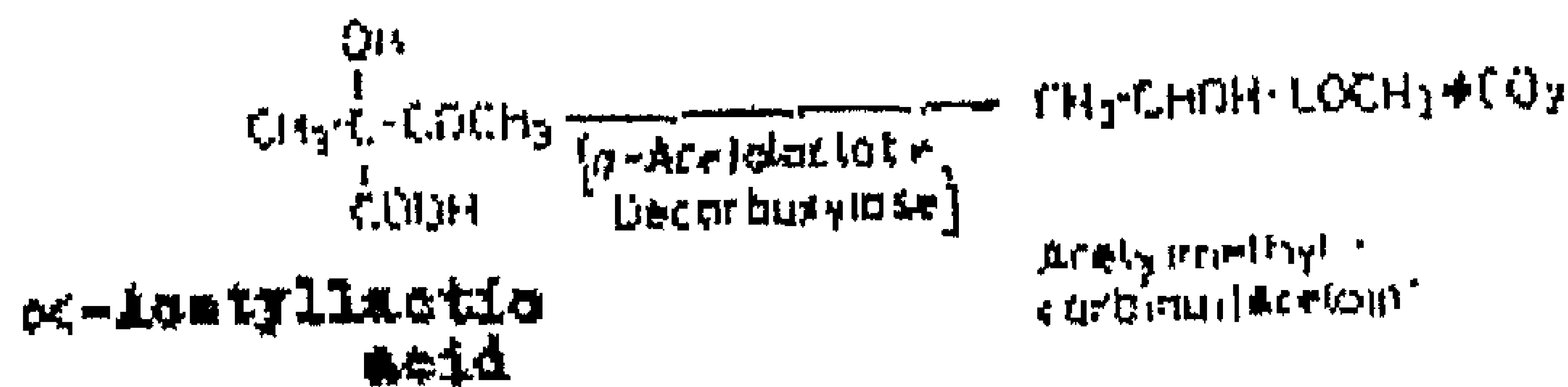
وهناك احياء مجهرية قادرة على تحويل حامض البيروفيك إلى الاستوئين Acetion والمركبات المشتقة منه مثل 3 .butandiol2 إن التفاعل الأساس لتخليق الاستوئين Acetoin في البكتريا، ناتج عن تكاثف جزيئتين من حامض البيروفك إلى α-Acetyl lactic acid بمشاركة التميم الأنزيمي TPP(شكل 3-12 التفاعل 6) حيث يرتبط جزيئة بيروفات مع المركب TPP لتكوين TPP-pyruvate لا يلبث أن يتحول إلى Acetaldehyde-TPP بوجود الأنزيم Pyruvate decarboxylase (انظر المعادلة 3-15 والخطوة الحادية عشرة في الإختمار الكحولي فقرة 3-1-1-1).

يتفاعل حامض البيروفك مع Acetaldehyde- TPP (تفاعل 6 شكل 3-12) كما يأتي:



(66-3) ...

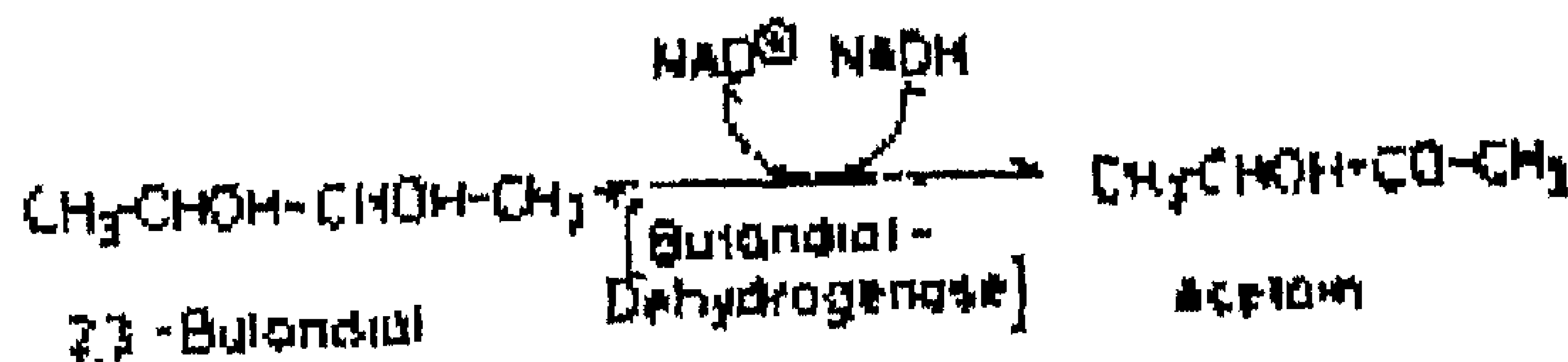
وبعد إزالة مجموعة الكربوكسيل، يتحول α-Acetyl lactic acid إلى Acetion (تفاعل 7، شكل 3-12):-



(67-3) ...

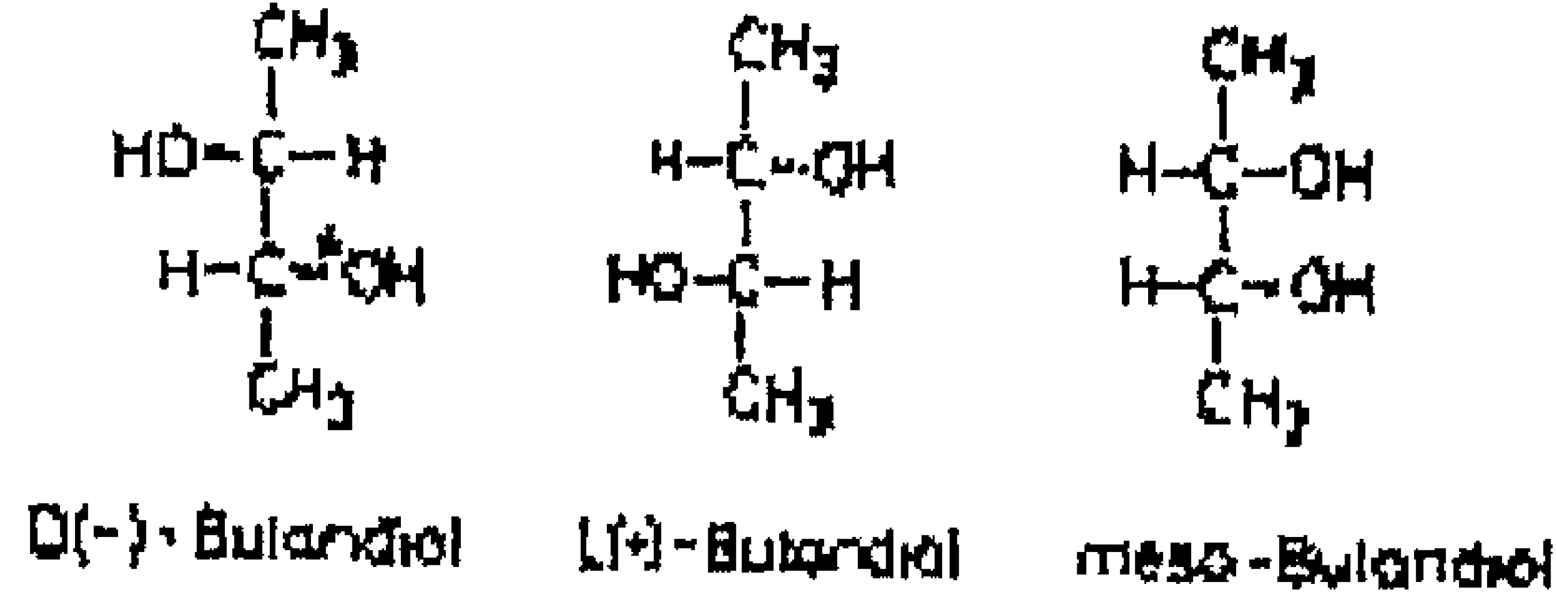
إن إزالة الكربوكسيل تتم بخصوصية فراغية Stereopecifically يختلف تكوين الاستوئين في الخميرة عنه في البكتريا وذلك لإن العملية تتم بتكاثف جزيئة واحدة من الاستالدهيد الفعال CH3- CHO TPP مع جزيئة استالدهيد وتتم العملية بالفعل التحفيزي لأنزيم واحد (عكس الحالة مع البكتريا) وهو الأنزيم decarboxylase pyruvate.

ويمكن اختزال الاستوئين (تفاعل 8- شكل 3-12) إلى 2.3 Butandiol بواسطة أنزيم شديد التخصص وهو NAD- oxidoreductase (2.3 Butandiol NAD- Butandiol-dehyrogends.



(68-3) ...

يوجد ثلاث متناظرات فراغية للبيوتان ثنائي الهدروكسل Butandiol ويمكن الحصول عليها جميعا من أحياء مجهرية متخصصة.



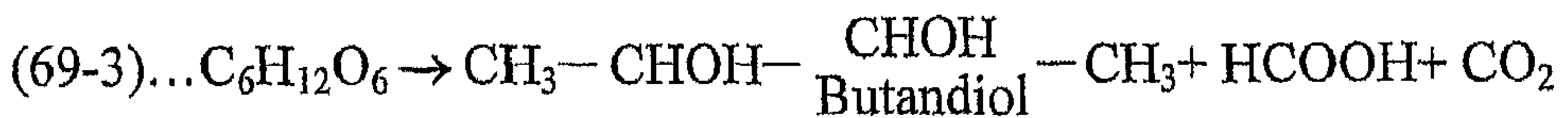
ويلعب اختمار البيوتان ثنائي الهدروكسيل diol– دوراً في التكنولوجيا حيث يعد مادة أولية مهمة لتصنيع المطاط.

يمكن تمييز ثلاثة أنواع من الاختمار المركب Butandiol استناداً إلى المركبات الثانوية الناتجة:

أ- مجموعة Diol-formic acid (Serratia marcescens) وتنتج حامض الفورمك إضافة إلى Butandiol

ب- مجموعة Diol- H_2 (Klebsiella aerogenes)

وتنتج H_2 إضافة إلى Butandiol



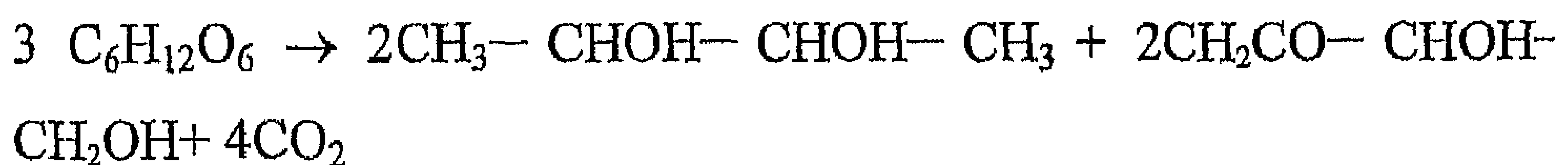
$$(69\text{-}3)\ldots C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3-CHOH-\underset{\text{Butandiol}}{CHOH}-CH_3+HCOOH+CO_2$$



$$(70\text{-}3)\ldots C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3-\underset{\text{Butandiol}}{CHOH}-CHOH-CH_3+2CO_2+H_2$$

ج- Bacillus subtilis Diol-Glycerol

وتنتج Glycerol إضافة إلى Butandiol



$$3\ C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3-CHOH-CHOH-CH_3+2CH_2CO-CHOH-CH_2OH+4CO_2$$

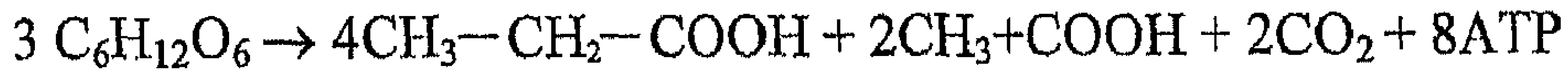
يمكن أن يستغل الإختمار الأخير لإنتاج الكسيرول، ذلك لإن الكلسيرول يشكل أكثر من 50٪ من السكر المختمر وهذه النسبة أعلى منها للإختمار الناتج عن إضافة الكبريتيت إلى الخميرة وحيث تكون 30٪.

3-1-1-5 الإختمار المنتج لحامض البروبيونك

ليس لهذا النوع من الإختمار أهمية صناعية وذلك لإن إنتاج حامض البروبيونك بطريقة كيميائية صرفة، أكثر نفعاً. إلا أن أهمية هذا الحامض تظهر في صناعة الألبان عند تصنيع بعض أنواع الأجبان الجافة مثل ايمنتال Emmental ويصاحب العملية تحرر غاز CO_2 مؤدياً إلى تكوين فجوات في هذا النوع من الأجبان إضافة إلى النكهة الناتجة عن حامض البروبيونك.

يسبب هذا النوع من الإختمار، جنس بكتريا حامض البروبيونك وكمثال freudenreichii و P.shermanii و P.pentosaceum إضافة إلى أجناس أخرى وكمثال جنس Clostridium نوع Clostridium propionicum.

يمكن كتابة المعادلة الإجمالية المثالية كالآتي:

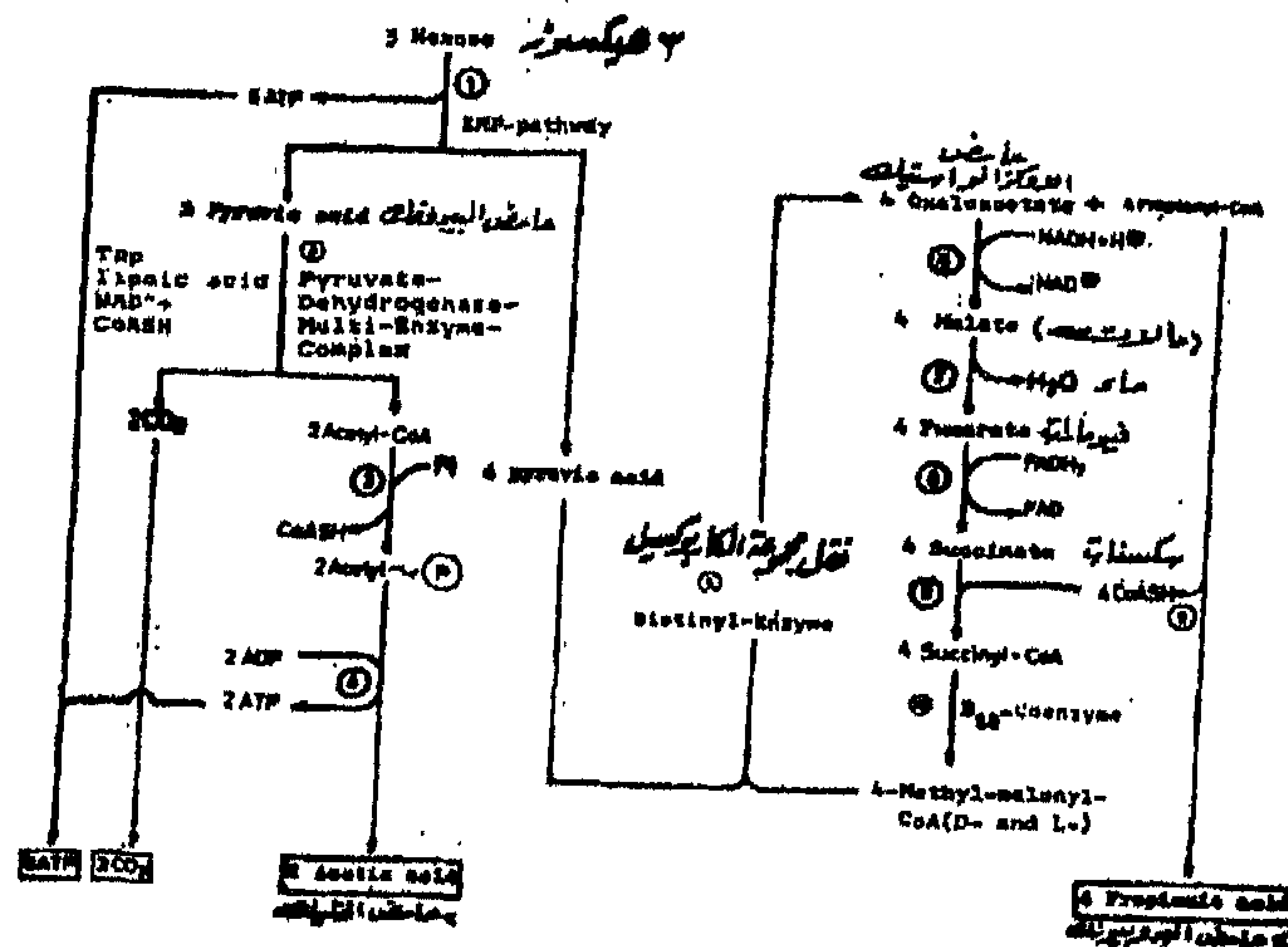


$$3\ C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4CH_3\text{—}CH_2\text{—}COOH + 2CH_3{+}COOH + 2CO_2 + 8ATP$$

أما المراحل الوسطية لهذا الإختمار فيمكن توضيحها في المخطط 3-13

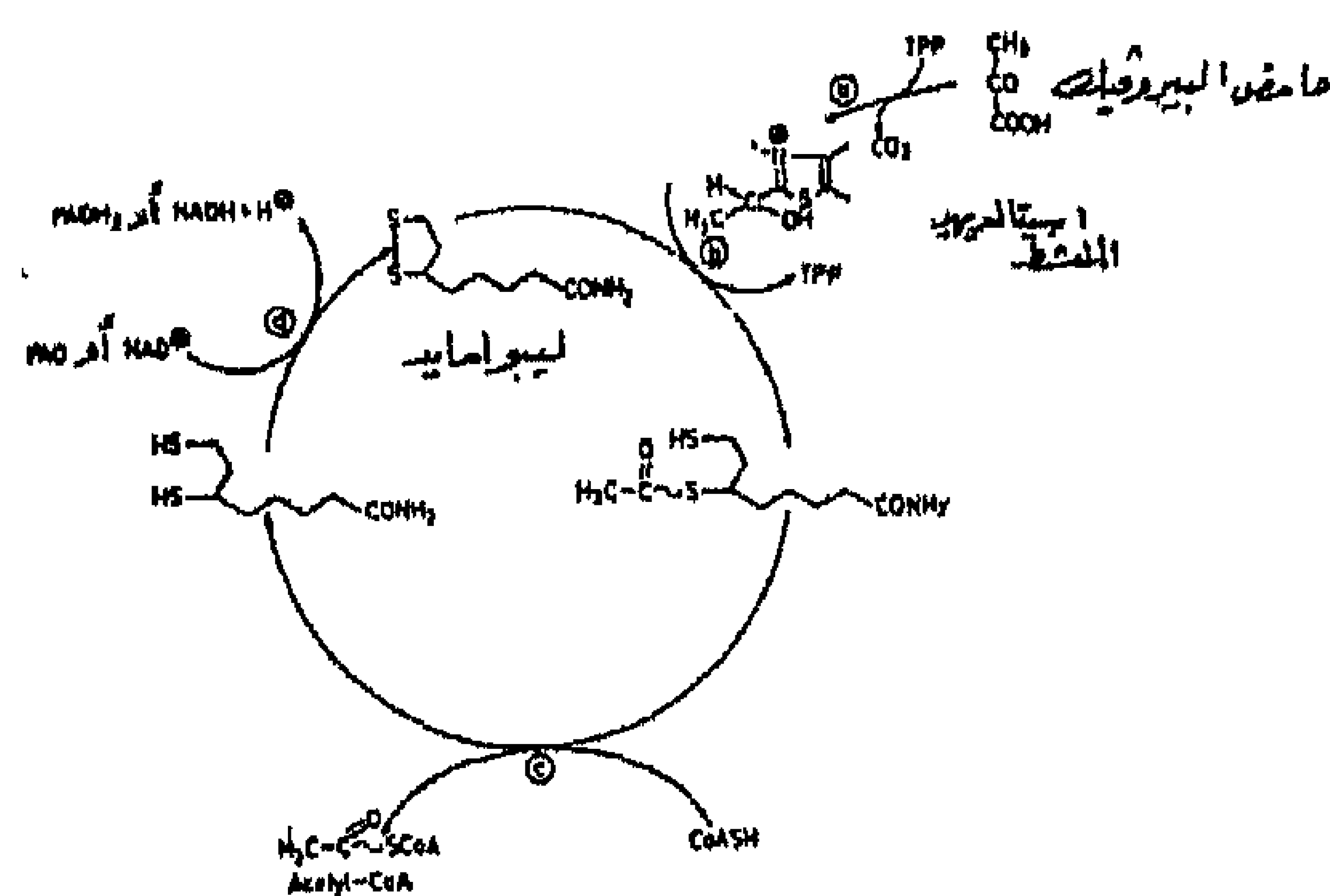
ففي **الخطوة الأولى** تتحول ثلاث جزيئات سكر سداسي الكربون إلى ست جزيئات حامض البيروفك بمسلك EMP وينتج عن العملية 6 جزيئات ATP.

الخطوة الثانية: بفعل المعقد متعدد الأنزيمات Multienzyme Complex المسمى Pyruvate dehydrogenase Complex



شكل (3-13) الاختمار المنتج لحامض البروبيونك في جنس بكتيريا حامض البروبيونك.

يعمل هذا المعقد على أكسدة حامض البيروفك إلى استيل تميم الأنزيم A(Acetyl CoA) وCO_2 ويشترك في هذا التفاعل ثلاثة أنزيمات شكل (3-14).



... (3-14) تحويل حامض البيروفك إلى Acetyl- CoA بواسطة المعقد متعدد الانزيمات (Bruchmann, E., E., 1979) Pyruvate-dehydrogenase Complex

في الخطوة a من الشكل (3-14) تنتزع مجموعة الكربوكسيل من البيروفات بوجود الأنزيم Pyravate dehydrogenase والتميم الأنزيمي (TPP) Thiamine pyropphos- phate وينتج استيالدهيد فعال CH_3-CHOH-TPP يسمى الفا- هدروكسي اثيل- TPP وفي الخطوة b وبفعل الأنزيم Dihydrolipoyltransacetylase والتميم الأنزيمي Lipoamide يؤكسد الاستيالدهيد الفعال إلى استيل لبواميد Acetyly lipoamide ويتحول الأخير في الخطوة C إلى Acetyl CoA و Lipoamide بواسطة الأنزيم ذاته وبوجود التميم الأنزيمي CoenzymeA)A) وفي الخطوة d يتحول اللبواميد المختزل Reduced lipomide بواسطة الأنزيم Dihydrolipoyl dehydrogenase والتميمين الأنزيمين FAD و NAD^+ على التوالي، إلى حالته المؤكسدة. تتم هذه العملية في الأيض الهوائي بوجود فلافوبروتين ذي المجموعة الضميمة FAD كما ذكرنا أما في الإختمار اللاهوائي المؤدي إلى حامض البروبيونك فمن المحتمل أن يكون NAD^+ المستقبل المباشر لذرات الهدروجين من اللبواميد المختزل. ويعد ثاني أوكسيد الكربون المتحرر ناتجاً نهائياً بعد إزالة الهدروجين من البيروفات في الإختمار المنتج لحامض البيروبيونك.

الخطوة الثالثة: يتحول Acetyl -CoA إلى Acetylphosphate بواسطة الأنزيم phate acetyl transferase phos-.

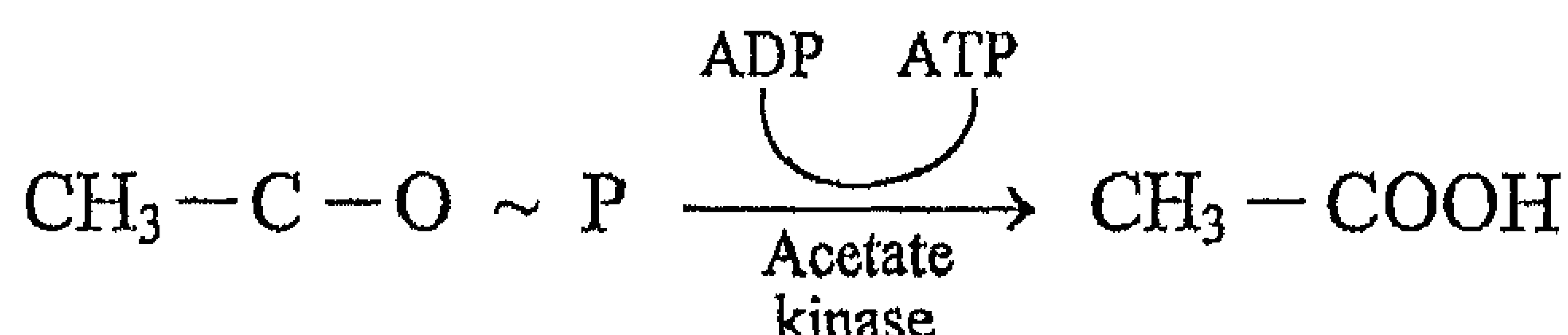


$$CH_3-\overset{O}{\overset{//}{C}} \sim SCoA + P_1 \quad CH_3-\overset{O}{\overset{//}{C}}-O\sim Ⓟ + CoASH$$

Phosphate- Acetyltransferase

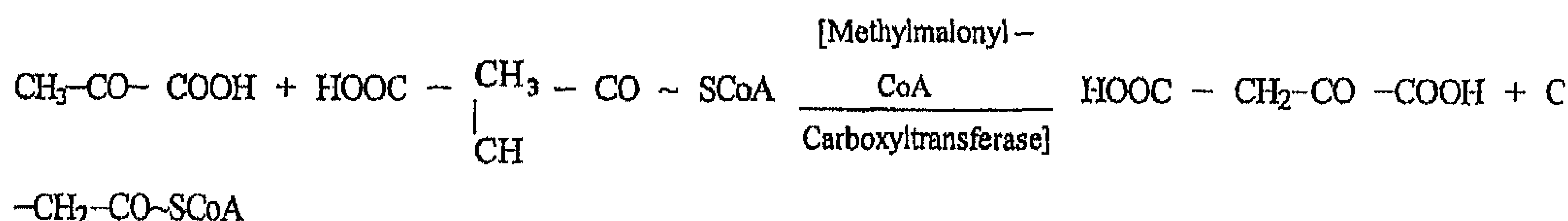
(73-3) ...

الخطوة الرابعة: يتحول فسفات الاستيل Acetyl-p إلى حامض الاستك في الوقت الذي تنتقل مجموعة الفسفات فيه إلى المركب ADP لتكوين ATP وتتم العملية بوجود الأنزيم Acetate kinase وبهذا يتكون ATP في هذه الخطوة إضافة إلى ما تكون في مسلك EMP.



(74 -3) ...

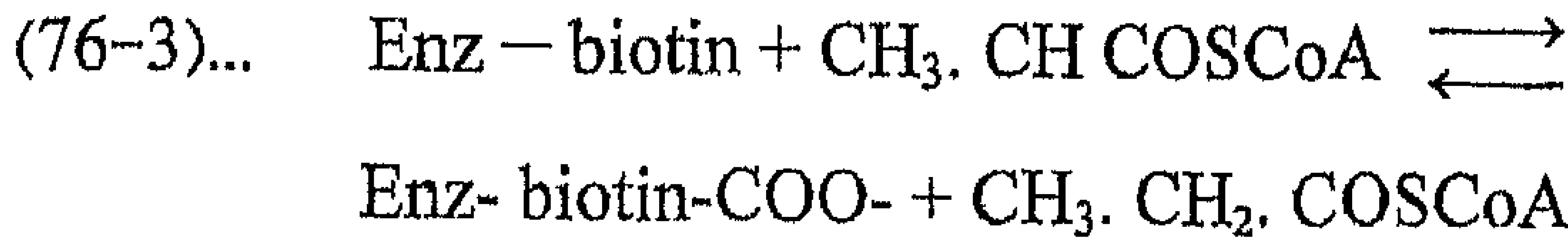
الخطوة الخامسة: يتكون حامض البروبيونك في البكتريا Propionic-bacteria نتيجة لنقل مجموعة الكربوكسيل Transcarboxylation بين حامض البيروفك والمركب: Methylmalonyl-CoA



(75-3) ...

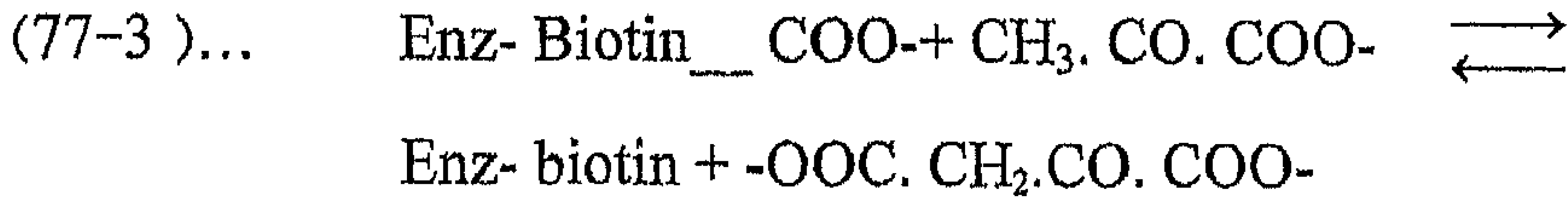
يحفز التفاعل الأنزيم Methylmalonyl CoA: Pyruvate Carboxyltransferase ذو التخصص المطلق للركيزتين. يمثل هذا التفاعل نوعاً نادراً من التفاعلات إذ تنتقل مجموعة الكربوكسيل من ركيزة إلى أخرى وتتم العملية على مرحلتين ويسهم البيوتين في العملية بارتباطه تساهمياً بمجموعة الكربوكسيل المنقولة وكما يأتي:

المرحلة الأولى يتم فيها انتقال مجموعة الكربوكسيل من المركب Methylmalonyl CoA إلى البيوتين المرتبط بالأنزيم ويتكون نتيجة لذلك Enz-biotin-COO- و Propionyl CoA:



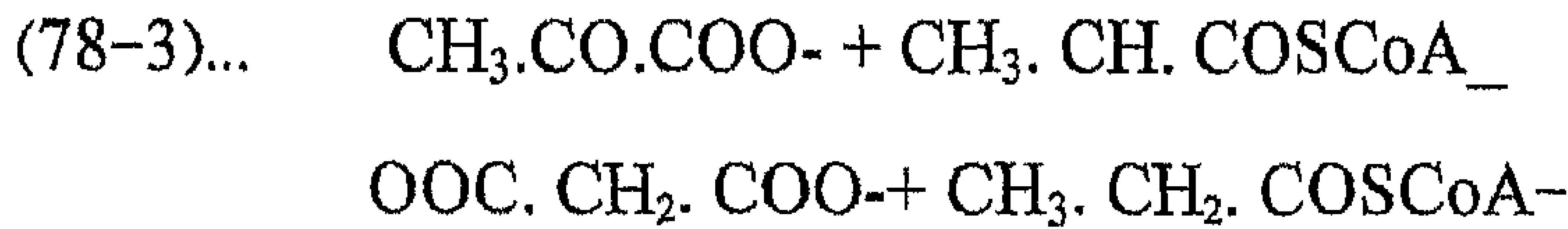
$$\text{(76-3)...}\quad Enz-biotin + CH_3.\overset{COO^-}{CH}\,COSCoA \rightleftharpoons Enz\text{-}biotin\text{-}COO^- + CH_3.CH_2.COSCoA$$

وفي المرحلة الثانية يتم انتقال مجموعة الكربوكسيل من البيوتين المرتبط بالأنزيم إلى البيروفات وينتج عن العملية تكوين الاوكزالوستات.



$$\text{(77-3)...}\quad Enz\text{-}Biotin__COO^- + CH_3.CO.COO^- \rightleftharpoons Enz\text{-}biotin + {}^-OOC.CH_2.CO.COO^-$$

وبذلك تكون محصلة المرحلتين إنتاج Propionyl CoA واوكزالواستات:



$$\text{(78-3)...}\quad CH_3.CO.COO^- + CH_3.\overset{COO^-}{CH}.COSCoA_ \quad OOC.CH_2.COO^- + CH_3.CH_2.COSCoA^-$$

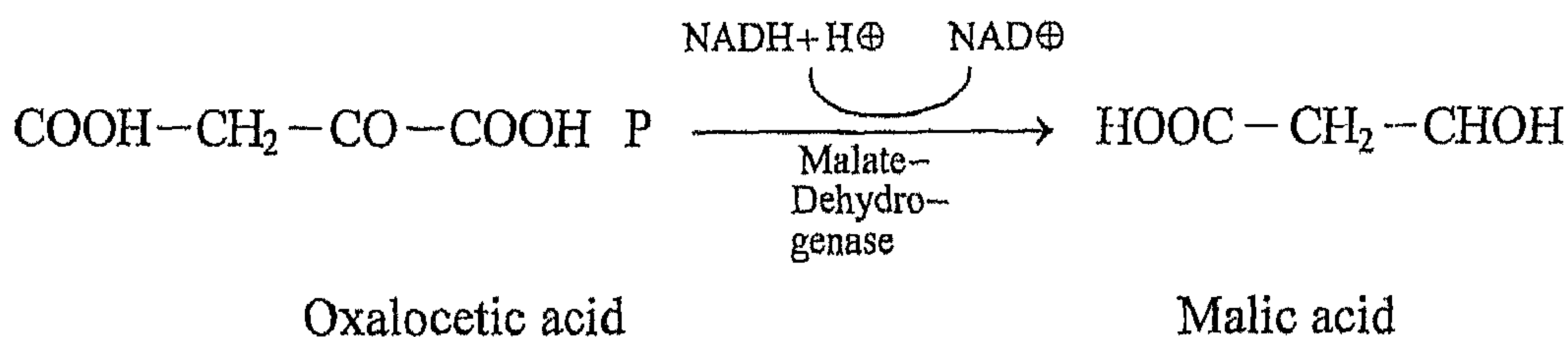
وفي أحياء مجهرية أخرى لا تتم عملية نقل الكربوكسيل إلى البيروفات نتيجة لفعالية الأنزيم الناقل للكربوكسيل المذكور أعلاه Carboxyltransferase Transcarboxylase وإنما نتيجة لتثبيته Fixation وسوف يتم توضيح ذلك في الإختمار المنتج لحامض الستريك.

الخطوة السادسة: يدخل الأوكزالواستات المتكون في الخطوة السابقة سلسلة تفاعلات تؤدي إلى توليده من جديد ليعمل واهباً للكربوكسيل مرة أخرى.

إن التفاعل الأول هو اختزال الاوكزالواستات إلى المالات بمساعدة الأنزيم

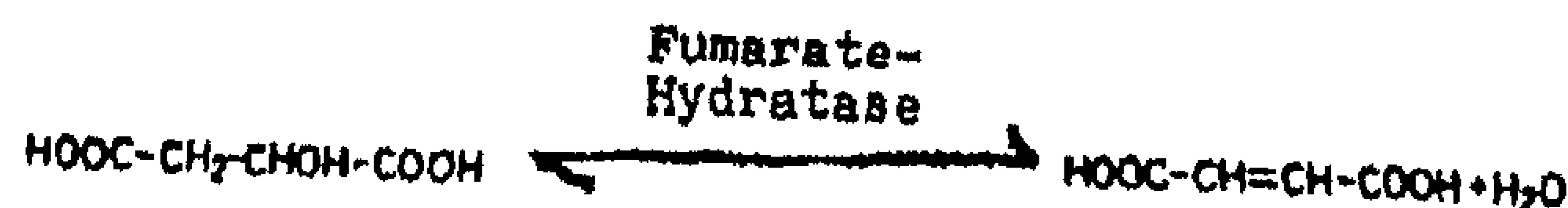


(L- Malate:NAD- oxidoreductase) Malate dehydrogenase



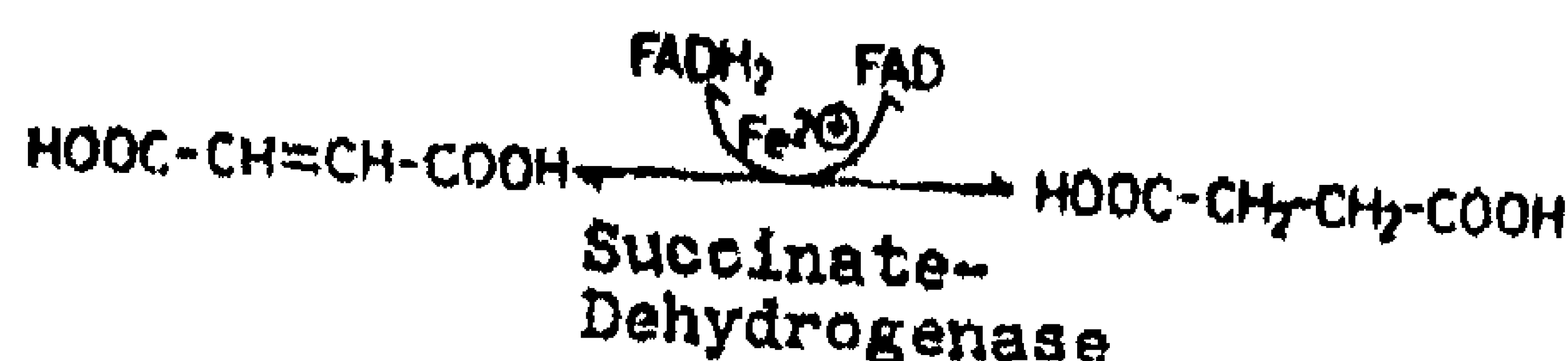
(79-3) .....

الخطوة السابعة: يتحول حامض المالك إلى الفيومارك بفعل الأنزيم -L Malate- Hydrolyase Fumarate hydratase



(80-3) ...

الخطوة الثامنة: يتحول حامض الفيومارك إلى السكنسك نتيجة لهدرجته تحت تأثير الأنزيم Succinate dehydrogenase

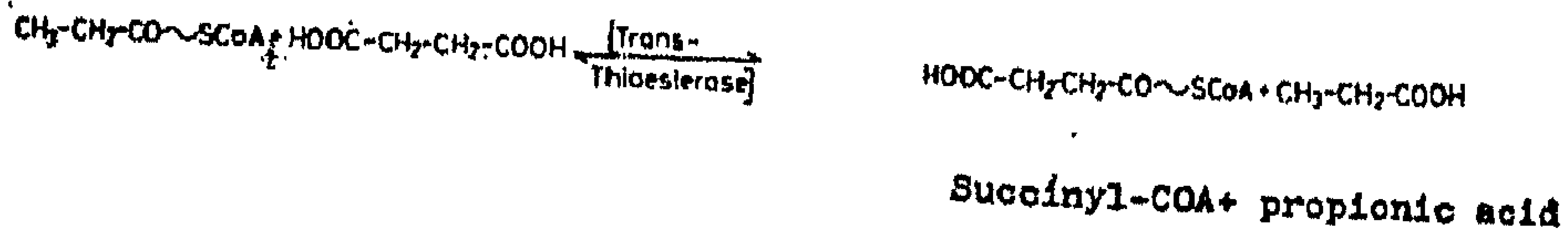


(81-3) ...

يحتاج الأنزيم في عمله إلى FAD بوصفه مجموعة ضميمة Prosthetic group والأيونات Fe^{2+} بوصفها تميما معامل Cofactor.

الخطوة التاسعة: يتفاعل حامض السكنسك المتكون في **الخطوة الثامنة** مع Propionyl-CoA المتكون في **الخطوة الخامسة** ويتم التفاعل بفعل الأنزيم

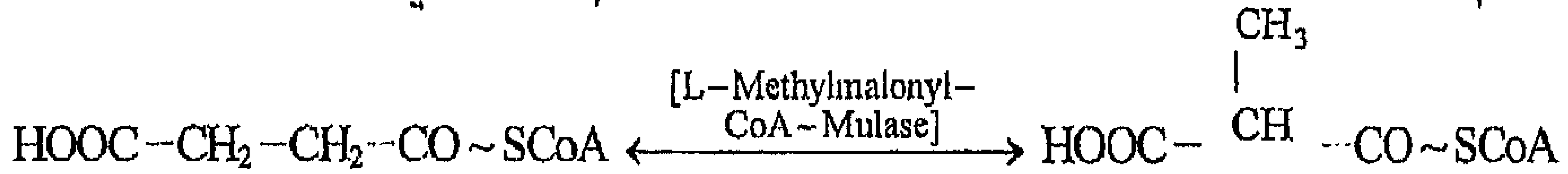
ويؤدي Trans- Thiosterase Succinyl CoA: Propionate CoA transferase إلى تكوين حامض البروبيونك كناتج للاختمار:



(82-3) ...

وتجدر الملاحظة هنا أن سلسلة التفاعلات للخطوات (7) و(8) و(9) تحصل في الإتجاه المعاكس لها في دورة كريبس

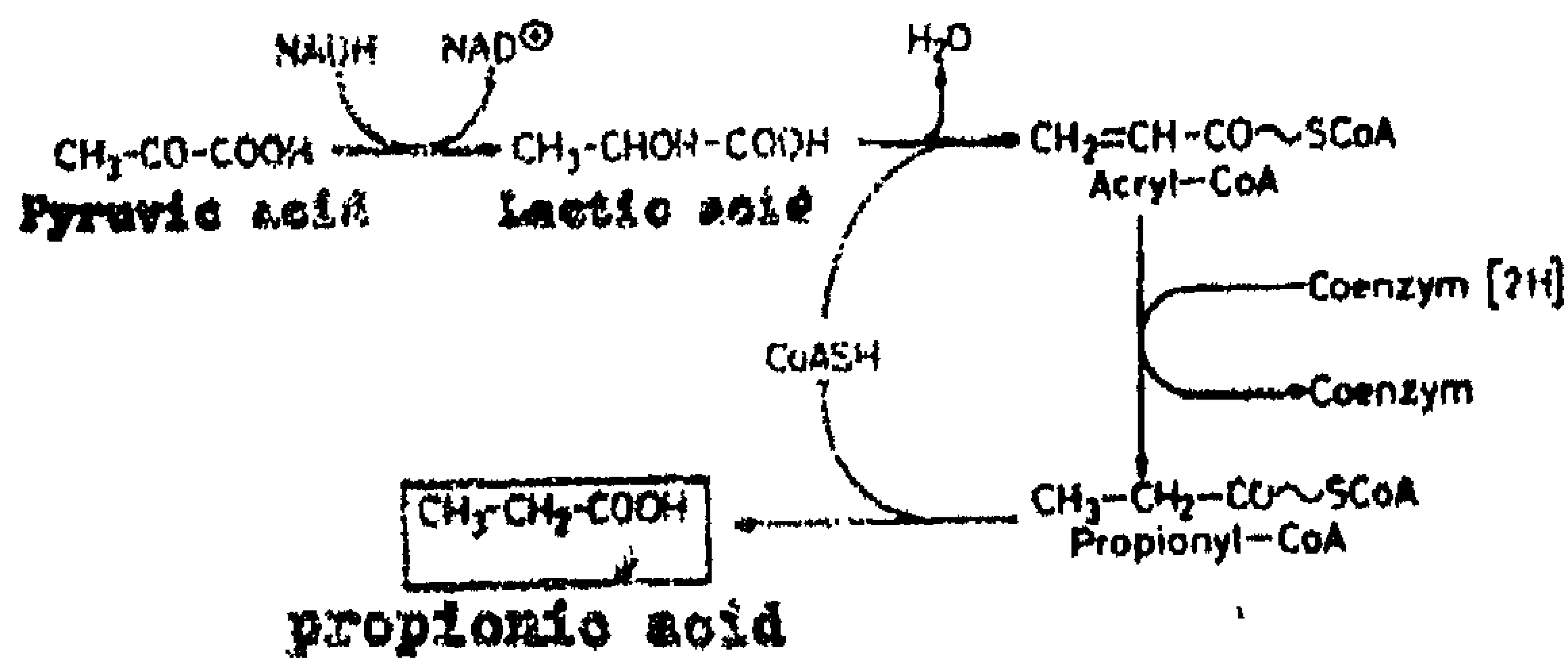
الخطوة العاشرة: يتحول Succinyl CoA إلى Methylmalonyl CoA بفعل الأنزيم L-Methylmalonyl CoA mutase والتميم الأنزيمي Vitamin B^{12}:



(83-3) ...

وبذلك يعاد توليد المركب Methylmalonyl CoA ليعمل مانحاً للكربوكسيل في تفاعلات نقل الكربوكسيل (انظر الخطوة الخامسة).

تتم سلسلة الخطوات المذكورة لإنتاج حامض البروبيونك في جنس بكتريا حامض البروبيونك Propionic acid bacteria ويختلف عما يحصل في جنس الكلوستردوم Clostridium propionicum وحيث يحصل الإختمار عبر حامض اللاكتك و Acryl CoA يوضح (شكل 3-15) المسلك المحتمل للاختمار المنتج لحامض البروبيونك في البكتريا Cl.Propionicum.



شكل (3-15) المسلك المحتمل للاختمار المنتج لحامض البروبيونك في البكتيريا
Cl. Propionicum

3-1-1-6 الاختمار المنتج للكحولات العليا

ينشأ عن الإختمار الكحولي في الخميرة مركبات تسمى الزيوت الكحولية Fusel oil وهي مزيج من مركبات صعبة التطاير وتضم الكحولات العليا والأحماض والاسترات والالدهيدات والاسيتالات ومنها 1 -Isoamylalcohol-3-methyl -butan- ol و 2-Methylbutan -1-ol.

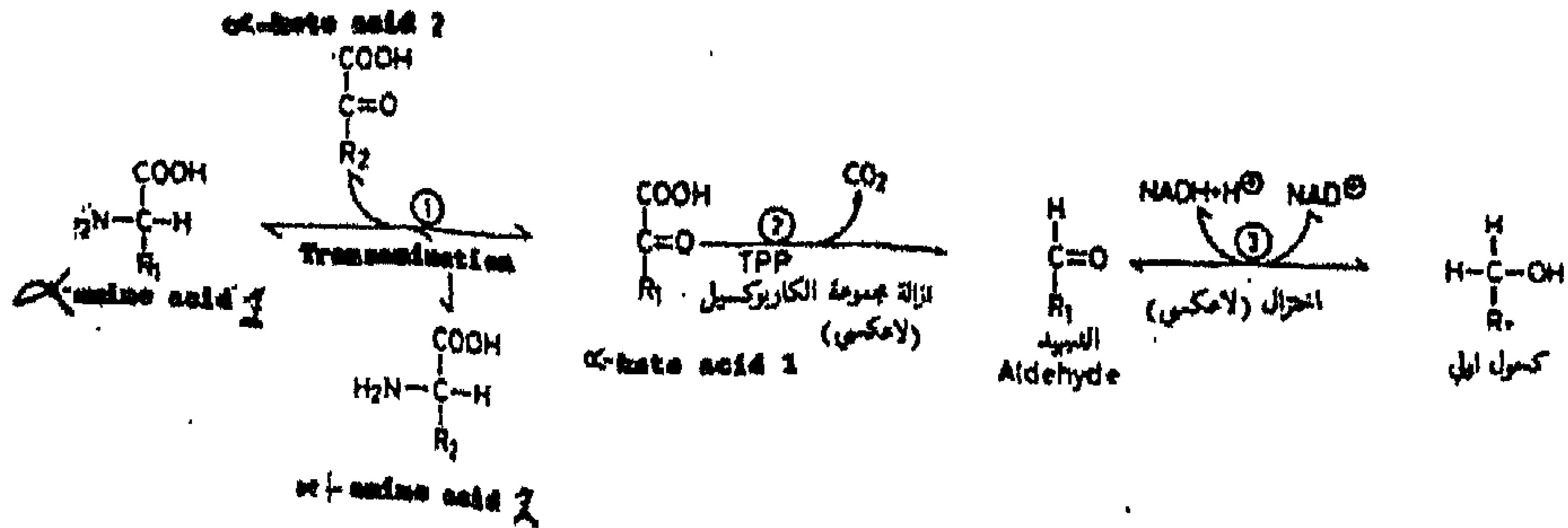
للمركبات التابعة للزيوت الكحولية تأثير كبير في نكهة النبيذ والبيرة والكونياك.

إضافة إلى الكحولات الإليفاتية العليا، تحتوي الكحولات الزيتية على كحولات اروماتية مثل β- phenylethyl alcohol و p-(Tyrosol) alcohol Hydroxyphenylethyl وتسمى جميعها fusel alcohols.

من المعروف أن الكلسيرول يتكون بوصفه ناتجا ثانويا في الإختمار الكحولي بسلك EMP(تحلل السكر، Glycolysis) في بعض الأحياء المجهرية كالخميرة إلا أن آلية تكون الكحولات العليا في أيض الكربوهيدرات غير معروفة. ولقد أوضح كل من F.Ehrlich و Neubauer و Fromherz و Genevois

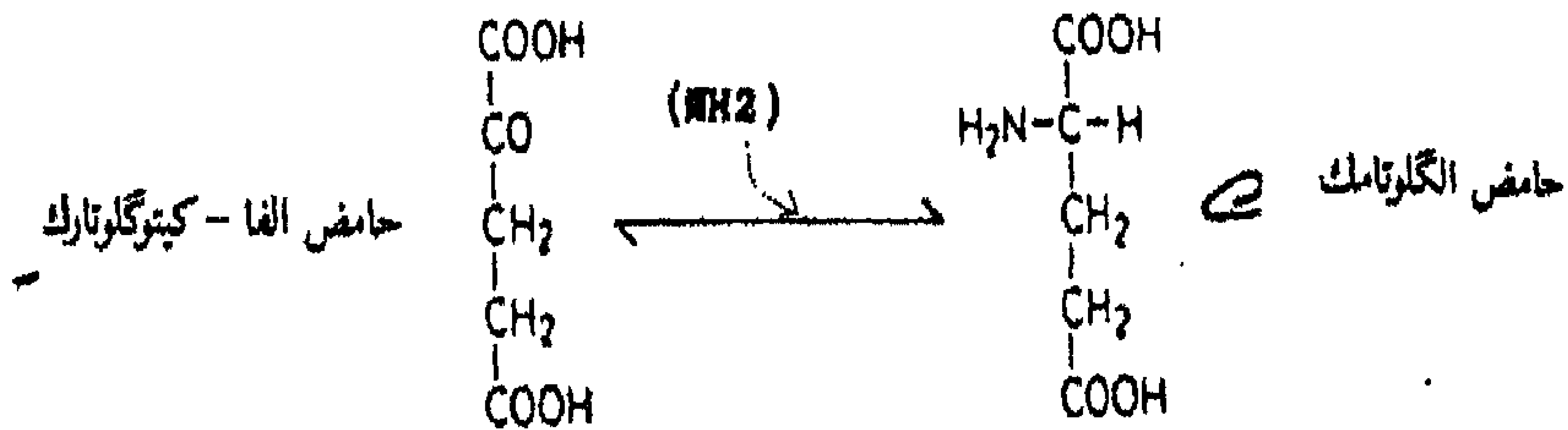
وآخرين بأن أيض الأحماض الأمينية يلعب دوراً حاسماً في تكوين الكحولات العليا.

يمكن تبيان كيفية تكوين هذه الكحولات من الأحماض الأمينية المناسبة في الشكل 3-16.



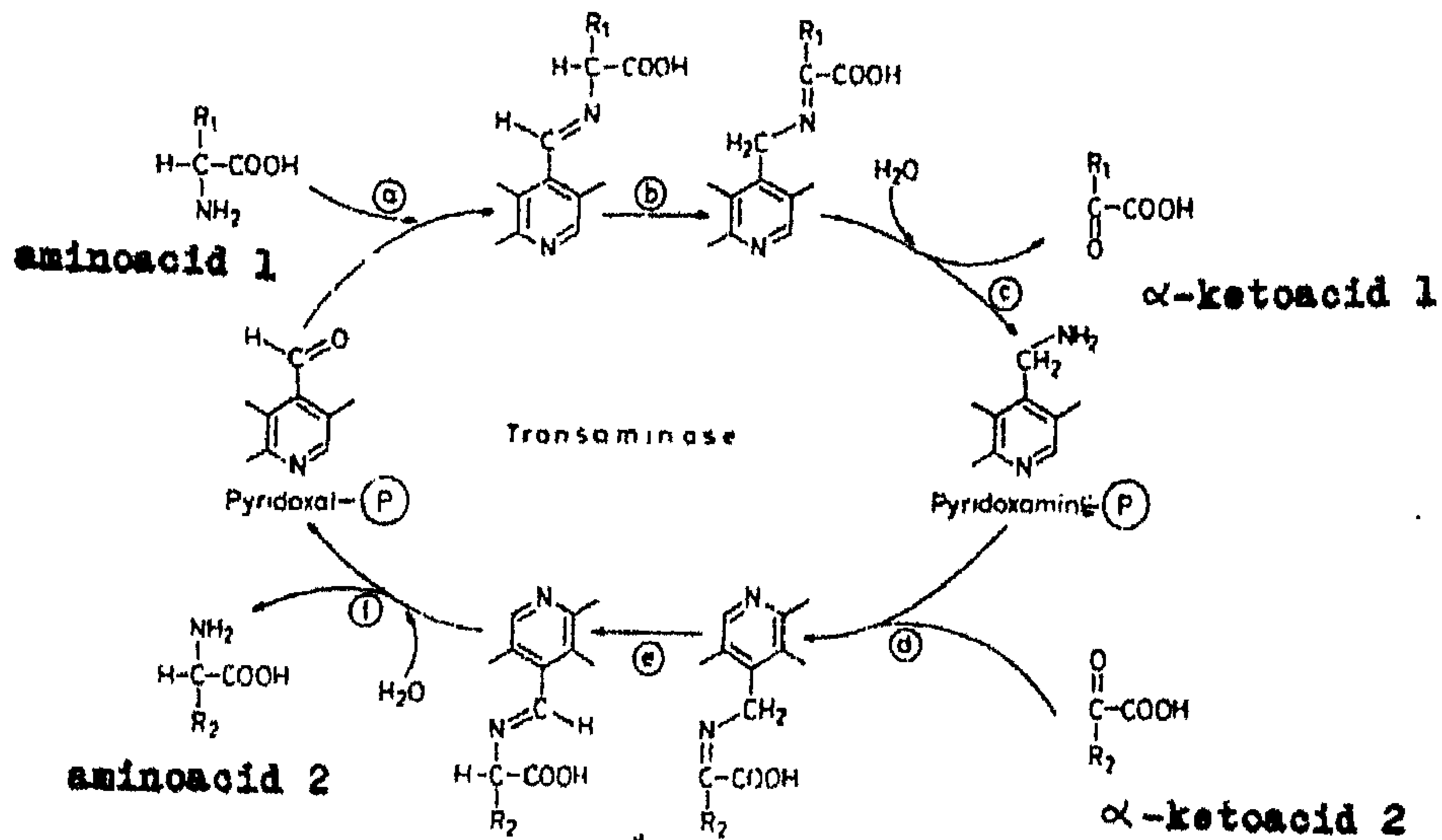
شكل (3-16) تكوين الكحولات العليا من الأحماض الأمينية المناسبة.

ففي **الخطوة الأولى** تنقل مجموعة الامينو من الحامض الأميني إلى حامض الفا- كيتو ويكون عادة α-ketoglutaric acid ويتحول بدوره إلى حامض الكلوتامك:



(3-84) ...

يسهم فسفات البيريدوكسيل Pyridoxal Phosphate في عملية نقل المجموعة الأمينية وكما يوضح ذلك الشكل (3-17).



شكل (3-17) تفاعلات نقل مجموعة الأمين وإسهام فسفات البيريدوكسال فيها ولتوضيح الشكل (3- 17) نتابع الخطوات a ←f

(a) يكون الحامض الأميني مع التميم الأنزيمي Pyridoxal phosphate ما يسمى بقاعدة شيف Schiff base

(b) و(c) بعد تحويل موقع الآصرة المزدوجة في قاعدة شيف يتم تحرير الحامض الفا- كيتو رقم (1) بالتحلل المائي ويتكون كذلك فسفات البيريدوكسامين phosphate Pyridoxamine.

(d) يتفاعل الحامض الفا- كيتو رقم (2) مع فسفات البيريدوكسامين لتكوين قاعدة شيف من جديد.

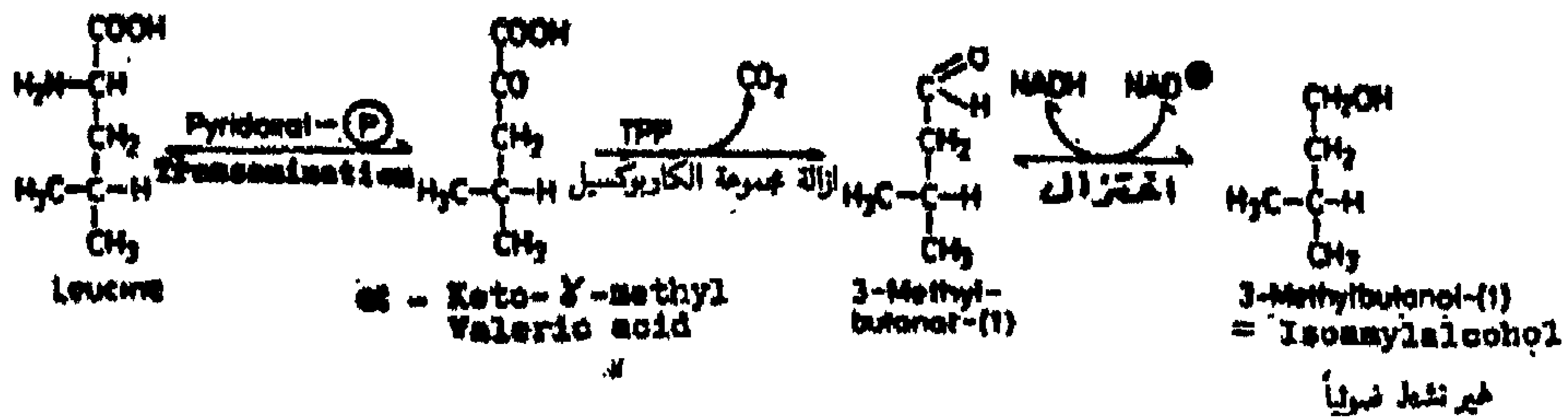
(e) (F) بعد تحويل موقع الآصرة المزدوجة والتحلل المائي، ينفصل الحامض الأميني رقم (2) ويتحرر فسفات البيريدوكسال من جديد وهكذا تستمر العملية.

الخطوة الثانية في تكون الكحولات العليا من الأحماض الأمينية:

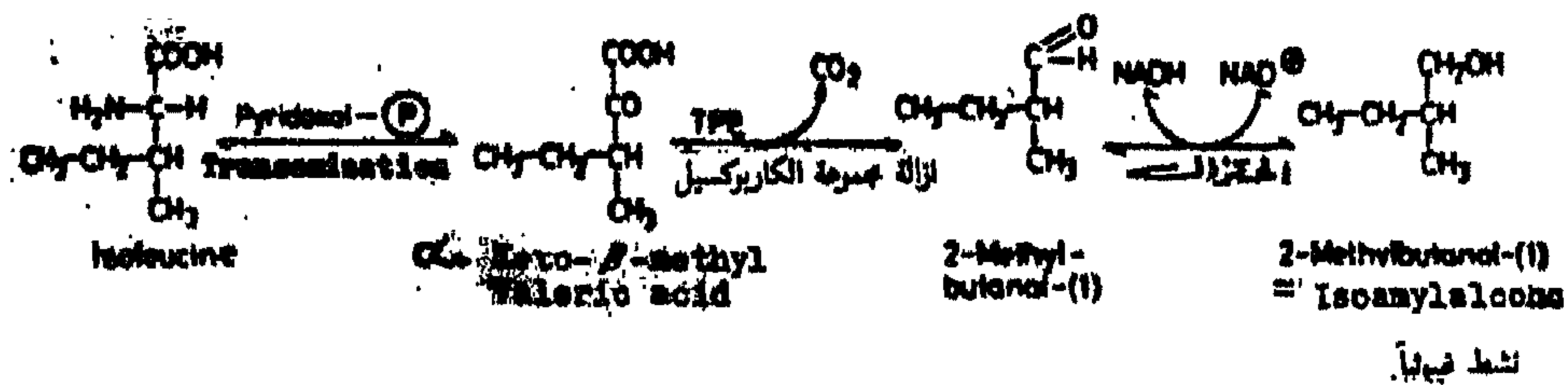
تزال مجموعة الكربوكسيل من الحامض الفا- كيتو حال تكونه وتتم العملية بوجود Thiamine Pyrophosphate وينتج عن العملية الدهيد.

الخطوة الثالثة: يختزل الالدهيد الناتج إلى كحول أولي بوجود NAD^+- Specific dehydrogenase ومن الجدير بالذكر أن الكحول الناتج تنقصه ذرة كربون إذا ما قورن بالحامض الأميني المتكون منه نتيجة لفقدان CO_2. إن الموازنة في التفاعل الأخير هذا تكون في صالح تكون الكحول في الخميرة نتيجة للرقم الهدروجيني الحامضي الضعيف.

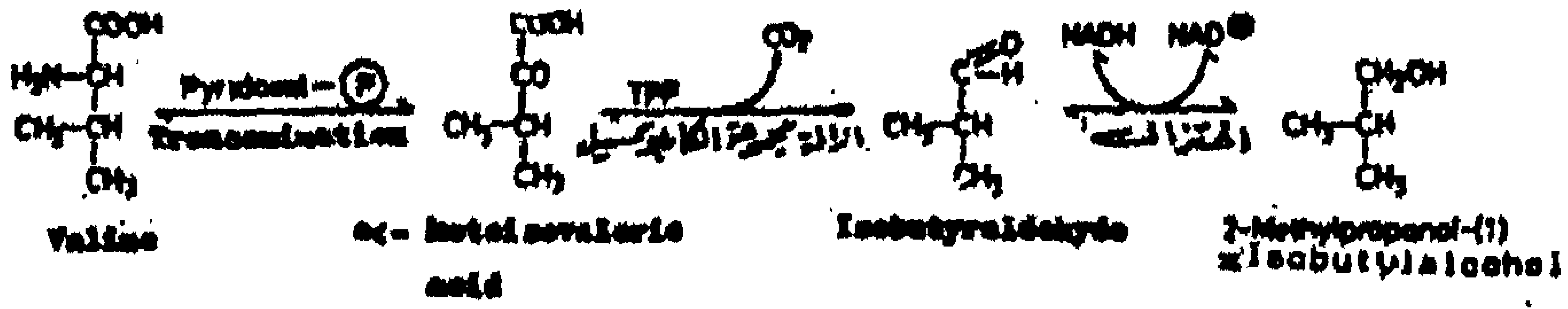
توضح المعادلات الآتية تكون أهم الكحولات العليا Fusel alcohols من الأحماض الأمينية المناسبة.



(85-3) ...



(86-3) ...



(87-3) ...

3-1-1-7 اختمار أحماض الثمار

يقصد بأحماض الثمار كل من حامض المالك L-Malic acid وحامض التارتارك Tartaric acid وحامض الستركCitric acid.

توجد هذه الأحماض بصورة طبيعية في الفواكه ويكون حامض المالك أكثرها انتشارا ويكون حامض السترك موجودا معه عادة. أما حامض التارتارك فيوجد بكميات كبيرة في العنب.

يعد حامض التارتارك إضافة إلى السترك من المواد المنكهة في معامل الأغذية ويتكون عادة بوصفه ناتجا ثانويا في الإختمار الكحولي في العنب حيث يترسب في هذه العملية بشكل بوتاسيوم هدروجين تارتارات ويمكن فصله بعد ذلك.

يمكن إنتاج حامض السترك في الصناعة بكميات كبيرة بعملية التخمر بواسطة Aspergillus niger علما بأنه لا يوجد في الوقت الحاضر دور يذكر لإنتاج حامض السترك من الفواكه الحمضية.

يلعب اختمار حامض السترك بواسطة البكتريا، دورا مهما في تصنيع بعض منتجات الألبان وكمثال لتكوين المركب Acetion الذي ينشأ منه المركب Deacetyl الذي يعد بدوره من المركبات التي تكسب الزبدة نكهة لذيذة.

يتحلل حامض التارتارك بصعوبة كبيرة جدا تحت الظروف اللاهوائية ولذا لا يلعب اختماره دورا يذكر عند صناعة النبيذ من العنب.

الاختمار اللاهوائي لحامض المالك:

تسبب بكتيريا حامض اللاكتك مثل Micrococcus maldacticus و Micrococ- cus acidovorax و Bacterium gracile نكوص حامض المالك لاهوائيا في النبيذ ويتم ذلك بإزالة الكربوكسيل من حامض المالك وتكوين حامض البيروفك ثم اختزال الأخير إلى حامض اللاكتك (شكل 3-18).

يتم التحول المباشر لحامض المالك إلى البيروفك بواسطة الأنزيم: L-Malate NADP Oxidoreductase (decarboxylating) أي ما يسمى Malic enzyme) تفاعل رقم 1 شكل 3-18) أما اختزال حامض البيروفك إلى اللاكتك فيتم بفعل الأنزيم Lactate dehydrogenase.

يمكن كذلك تحويل حامض المالك إلى البيروفك على مرحلتين وذلك بإزالة ذرتي هدروجين من الجزيئة أولا بفعل الأنزيم Malate dehydrogenase المستخدم للتميم الأنزيمي NAD^{+} L- Malate: NAD Oxidoreductase.

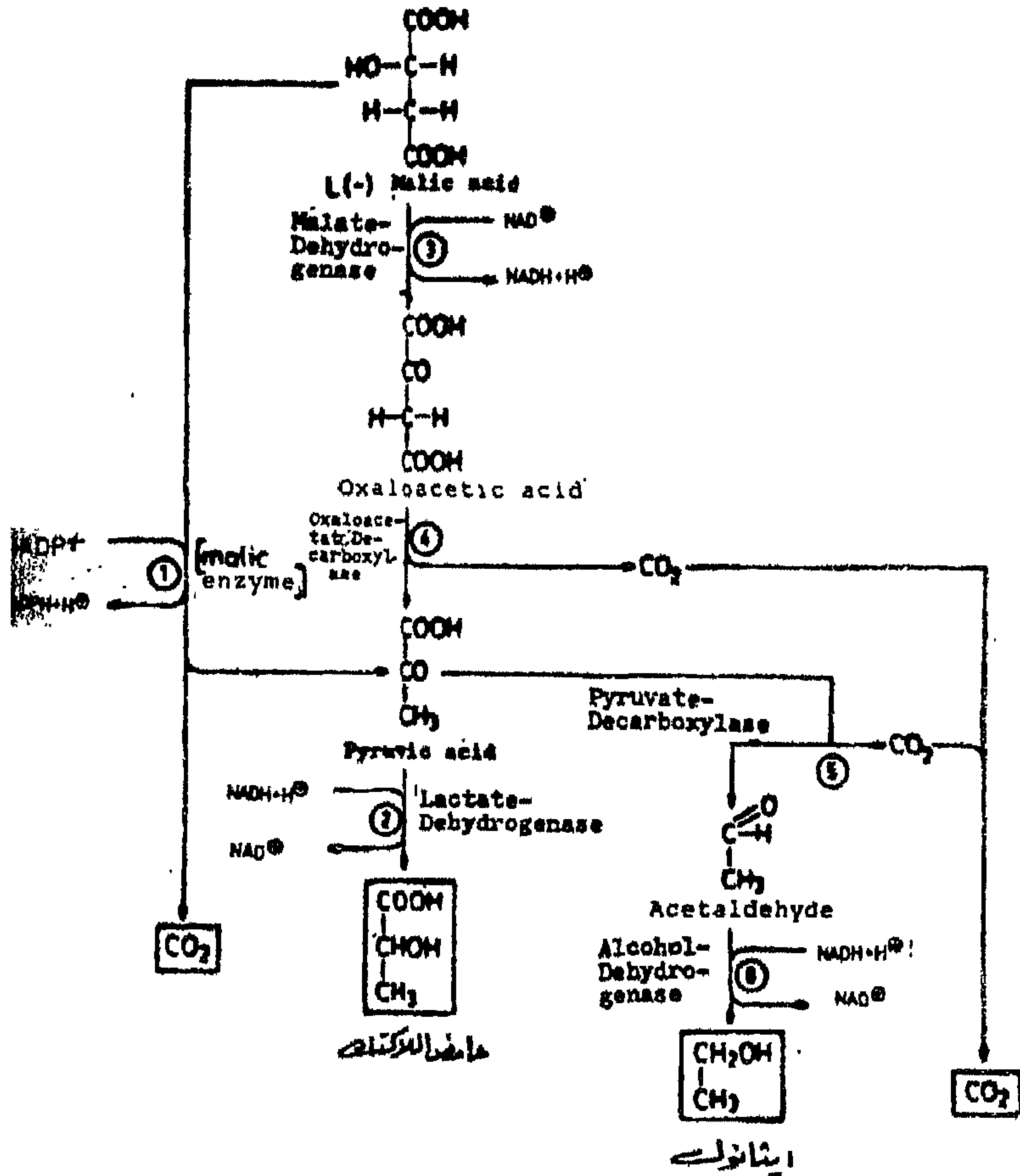
يتحول حامض الاوكزالواستك الناتج عن التفاعل أعلاه إلى حامض البيروفك نتيجة إزالة الكربوكسيل بفعل الأنزيم (Oxaloacetate Carboxylyase) Oxaloacetate dcarboxylase) انظر التفاعلين 3 و4 شكل 3-18).

تستطيع بعض انواع من Schizosacheromyces تحويل الحامض المالك بالطريقة المذكورة إلى حامض البيروفك ثم إزالة الكربوكسيل من حامض البيروفك لتكوين الاستيالدهيد ثم اختزال الأخير إلى الإيثانول. إن الأنزيمين المسؤولين عن تكوين الايثانول من حامض البيروفك هما Pyruvate decarboxylase و Alcohol dehydrogenase على التوالي.

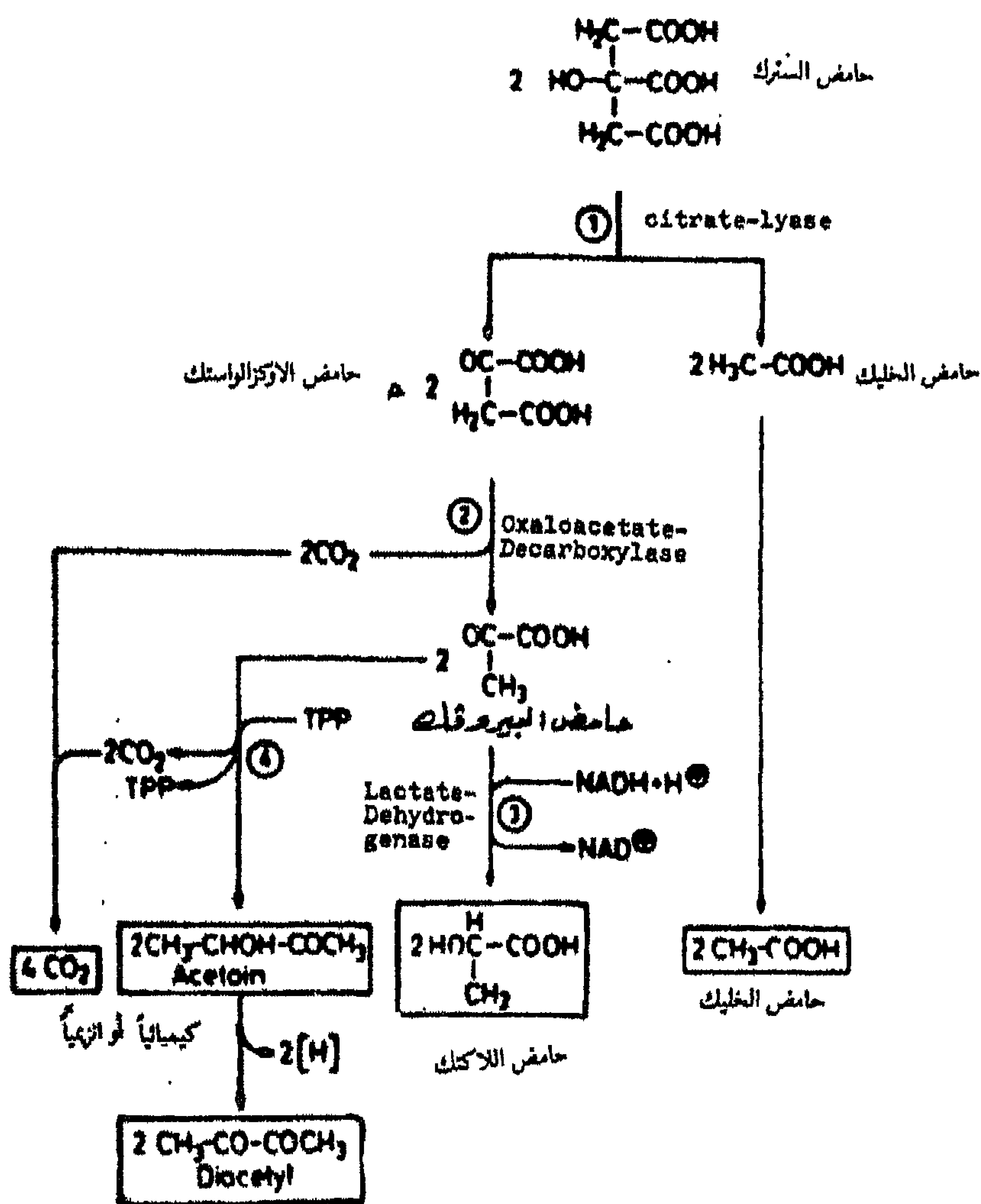
الاختمار اللاهوائي لحامض السترك:

يتم نكوص حامض الستريك (شكل 3-19) في أنواع بكتريا حامض اللاكتك Streptococcus cremoris و S. lactis و Leuconostoc Citrovorum

وينتج عن العملية حامض اللاكتك والخليك والمركب Acetoin الذي يتكون منه المركب Diacetyl الذي يكسب الزبدة نكهتها.



شكل (3-18) النكوص اللاهوائي Anaerobic degradation لحامض المالك بواسطة بكتيريا حامض اللاكتك وأنواع الـ Schizosaccharomyces.



شكل (3-19) النكوص اللاهوائي لحامض السترك في أنواع بكتيريا حامض اللاكتك.

يبدأ هذا الإختمار بتحلل حامض السترك إلى حامض الخليك وحامض الاوكزالواستك بفعل الأنزيم Citrate lyase (التفاعل 1، شكل 3-19) وعند إزالة الكربوكسيل يتحول الاوكزالواستك إلى البيروفك بواسطة الأنزيم boxy Oxaloacetate decar-lase. يختزل الجزء الأكبر من حامض البيروفك إلى حامض اللاكتك (تفاعل 3، شكل 3-19) وما تبقى منه يتكثف إلى Acetion

عبر المركب α- Acetyllactic acid وبمشاركة التميم الأنزيمي TPP. يتحول الاستوئين Acetoin إلى "مركب النكهة" Diacetyl نتيجة للتأكسد الذاتي أو ربما نتيجة عمل أنزيم مزيل للهدروجين.

لا يلعب الاختمار اللاهوائي لحامض السترك أو المالك دورا يذكر في إنتاج الطاقة للكائن المجهري وقد يكون بالإمكان إنتاج الطاقة على شكل ATP لو كانت عملية إزالة الهدروجين والكربوكسيل من حامض البيروفك مقرونة بوجود كل من TPP و CoASH و Lipoic acid و NAD^+ وعندئذ يكون بالإمكان تحويل Acetyl CoA الناتج إلى Acetylphosphate والمركب الأخير عالي الطاقة يمكن استخدامه لتخليق المركب ATP.

3-1-1-8 اختمارات أخرى

أ- اختمار حامض التارتارك:

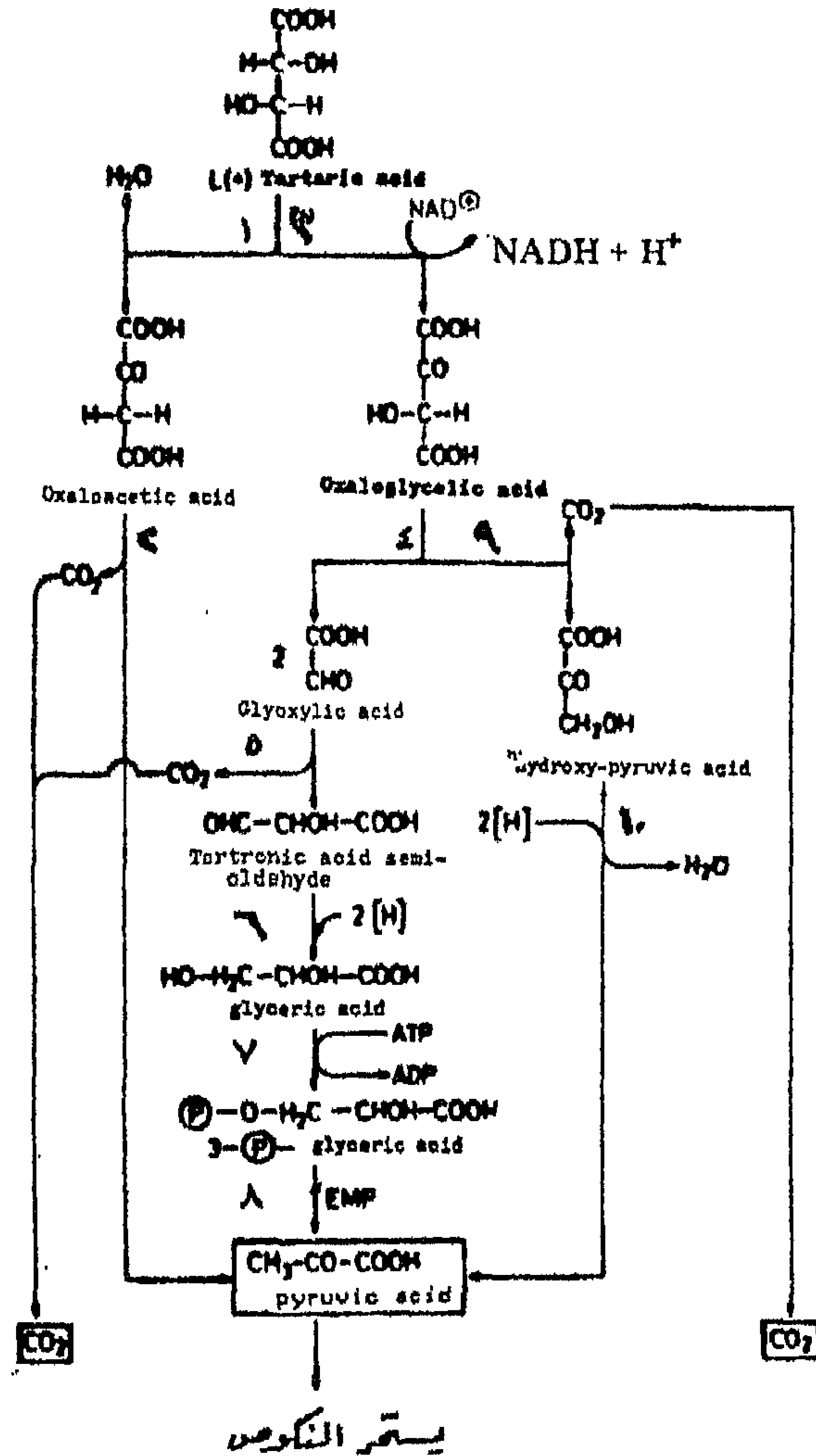
للنكوص اللاهوائي Anaerobic degradation لحامض التارتارك أهمية كبيرة في تكنولوجيا النبيذ لو توفرت الأحياء المجهرية القادرة على تحويل حامض التارتارك إلى ايثانول و CO_2، ففي الوقت ذاته تزال الحموضة الناتجة من وجود حامض التارتارك في النبيذ كما تزداد نسبة الكحول فيه.

ولقد افترض المخطط الآتي (شكل 3-20) لنكوص حامض التارتارك لاهوائياً.

أما تفاصيل المخطط المفترض فكما يأتي:-

الخطوة الأولى: تحول حامض التارتارك إلى حامض اوكزالواستك بعد إزالة جزيئة ماء منه ويتم هذا التفاعل في البكتريا psedomonas Putida.

الخطوة الثانية: تزال مجموعة الكربوكسيل من الحامض اوكزالواستك لتحويله إلى بيروفات ولقد امكن الكشف عن وجود هذا التفاعل في عدد من الأحياء المجهرية.



شكل (3-20) المخطط المفترض لنكوص Degradation حامض التارتاك لا هوائياً.

الخطوة الثالثة: لوحظ بأن البكتريا Pseudomonas acidovorans قادرة على تحويل حامض التارتارك إلى Oxalglycolic acid بواسطة أنزيم مزيل الهدروجين متخصص للتميم الأنزيمي (dehydrogenase NAD-Specific) NAD^+

الخطوة الرابعة: يستطيع المركب Oxaloglycollic acid إن يتحلل بطريقة كيميائية صرفة إلى جزيئتين من Glyoxylic acid

الخطوة الخامسة: تتكاثف جزيئتان من Glyoxylic acid مع فقدان CO_2 لتكوين Tartonic acid semialdehyde

الخطوة السادسة: يختزل Tartronic semidldehyde إلى Glyceric acid.

الخطوتين السابعة والثامنة: يتحول Glyceric aicd إلى 3-Phosphoglyceric acid الذي يدخل مسلك EMP (امدن- مايرهوف بارناس) لتحلل السكر ويتحول فيه إلى حامض البيروفك.

الخطوة التاسعة: يستطيع المركب Oxaloglycollic acid الناتج في التفاعل (3) أن يتحول إلى حامض البيروفك عن طريق إزالة مجموعة الكربوكسيل أولا حيث يتحول إلى Hydroxypruvic acid وفي تفاعل لاحق (**الخطوة العاشرة**، شكل 3-20) يختزل الحامض الناتج إلى حامض البيروفك.

يمكن لحامض البيروفك أن يتحول إلى مركبات أخرى وتبعا لنوع الأحياء المجهرية التي يحصل فيها التحول. فمثلا يمكن أن يختزل إلى حامض اللاكتك، أو يتحول إلى استيالدهيد بعد إزالة مجموعة الكربوكسيل ويختزل الاستيالدهيد إلى الايثانول. وفي صناعة المشروبات الروحية يفضل تحول حامض البيروفك إلى الايثانول

ب- الاختمار المنتج للميثان:

الاختمار المنتج للميثان نوع آخر من الاختمار اللاهوائي يكون المتقبل النهائي للالكترونات فيه مركبا غير عضوي ويعتقد بأن تثبيت الطاقة فيه يتم بالفسفرة على مستوى الركيزة وليس عن طريق السلسلة التنفسية.

تبدأ سلسلة تفاعلات الاختمار المنتج للميثان باستخدام الركائز الناتجة عن أنواع الاختمارات الأخرى كالخلات والبيوترات والفورمات والفاليرات Valerate والكبراوات Caproate.

وتستخدم كذلك جزيئات الهدروجين الناتجة في الاختمارات الأخرى بوصفها مصدرا لمكافئات الاختزال.

يحصل الاختمار المنتج للميثان في بكتريا الميثان Methano baceriom ويلعب دوراً كبيراً في اختمار الفضلات الصناعية وكمثال الفضلات الصناعية للمعامل والحاوية على السليلوز كفضلات معامل الأغذية.

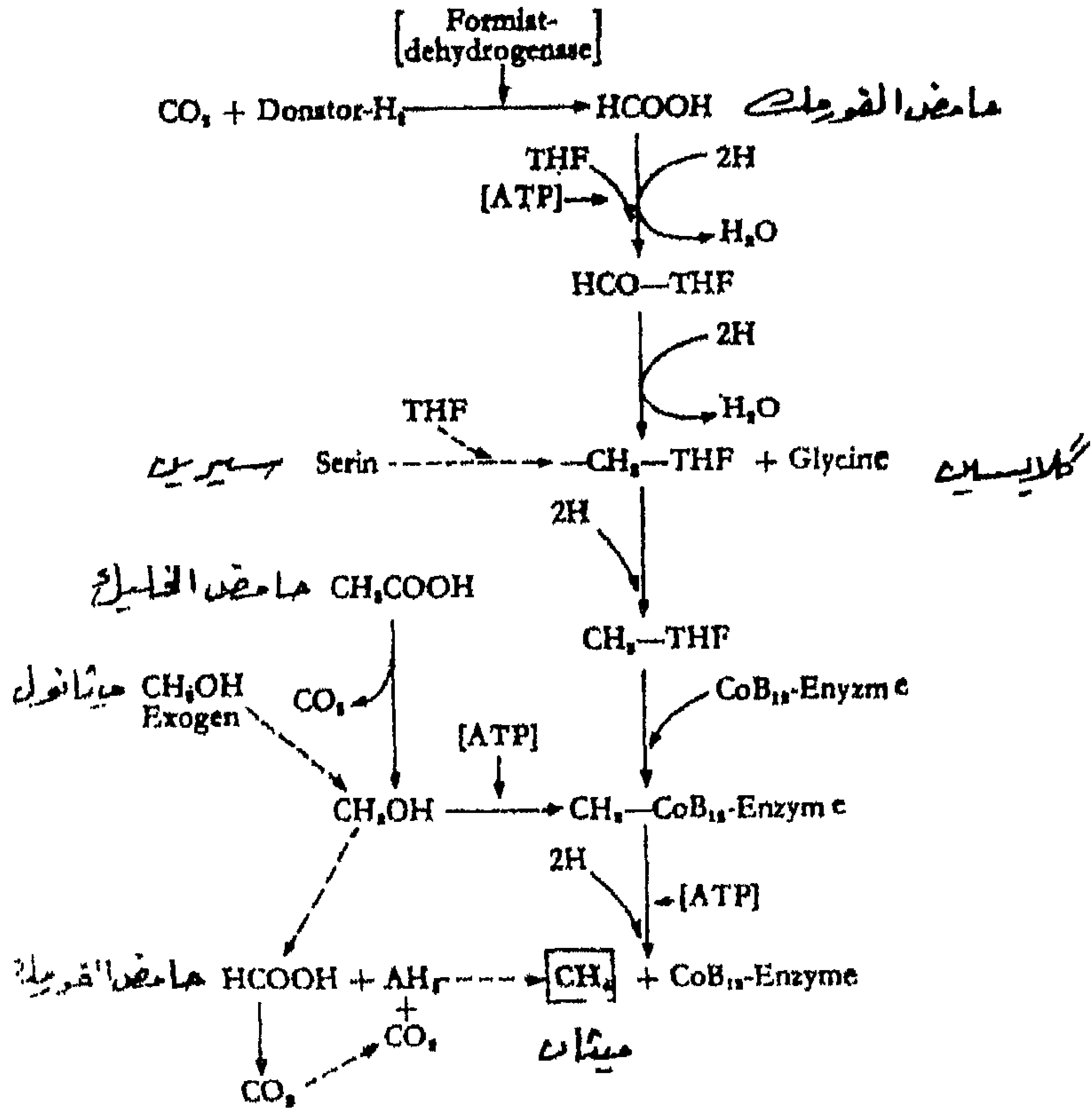
يوضح الجدول الآتي أنواعاً مختلفة من بكتريا الميثان والركائز التي تعمل عليها ومصدر ذرات الكربون في الميثان الناتج.

جدول 3-4 الركائز المستخدمة من قبل بكتريا الميثان في الاختمار المنتج للميثان.

الأحياء المجهرية	الركائز المستخدمة	مصدر ذرات الكاربون في الميثان
Mrtbanobacterium formicum	H_2 CO_2 Formate	CO_2
Metbanobacterium suboxydans	Butyrate. Valerate Caproate	CO_2
Metbanobacterium omelianskii	H_2 ethanol, prim.& sce. Altohole	CO_2
Metbanosarcina barkeri	H_2. CO_2 Methanol. Ethanol. Acetate	CO_2,CO
Metbanobacterium sobngenii	Acetate, CO_2. Butyrate	$^-CH_3$
Metbanosarcina metbanica	Acetate,Methanol. Buryrate	$-CH_3$

يجري التخمر المنتج للميثان بصورة عامة بحيث تنقل مكافئات الإختزال (ذرات الهدروجين أو الالكترونات) من الركيزة إلى CO_2 أو مجاميع المثيل وبذلك تختزل هذه المركبات إلى ميثان (CH_4). تتمثل المركبات الواهبة لذرات الهدروجين أو الالكترونات في H_2 و CO و Methanol و Acetate و Formate و Butyrate alerate و Caproate وإذا استخدم CO_2 بوصفه متقبلاً نهائياً لذرات الهدروجين، فيحصل

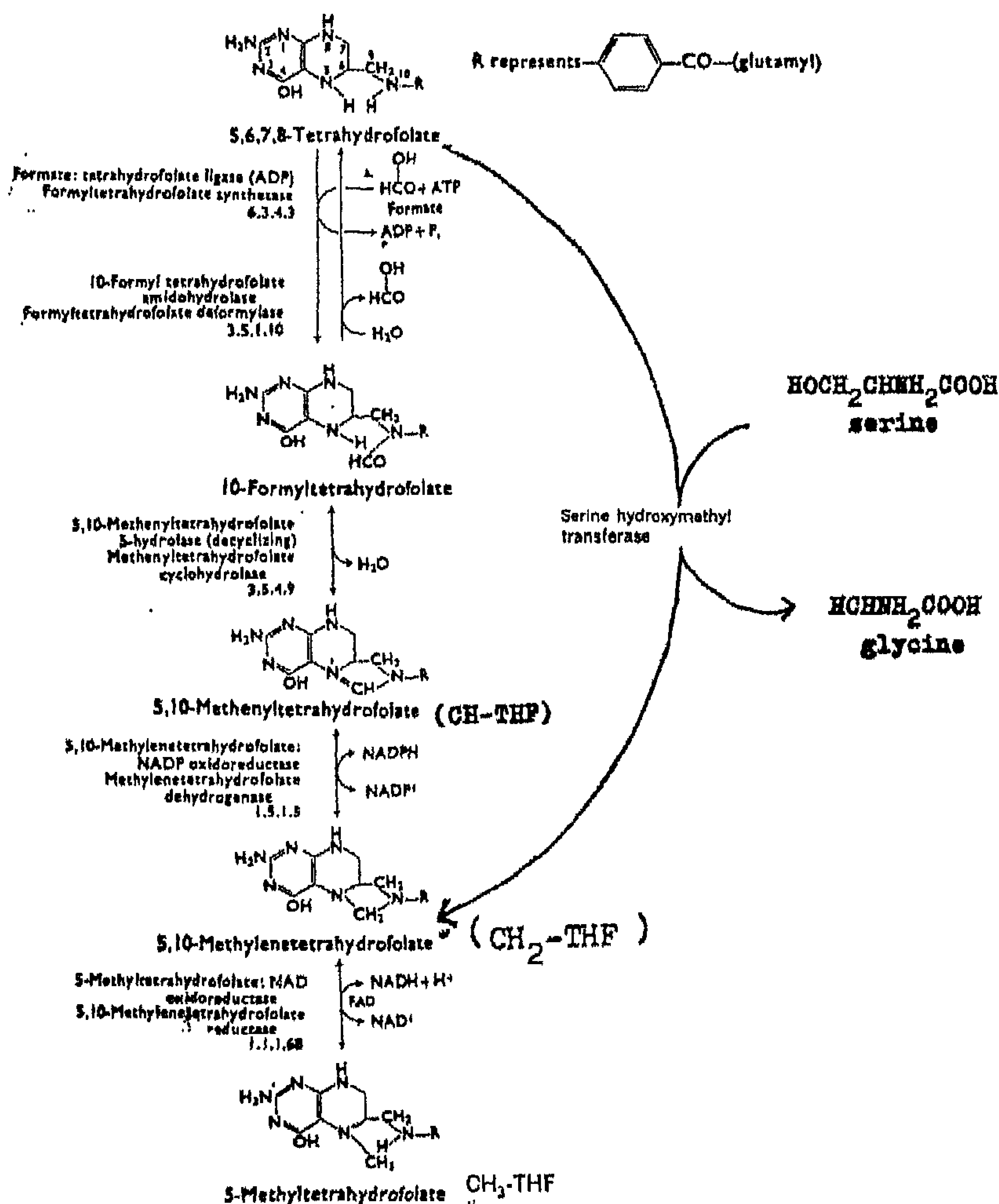
الاختـــزال بواســـطة Formate dehydrogenase ويتكـــون حـــامض الفورمـــك (شـكل 3-21). يستمر اختـزال حـامض الفورمـك بخطـوات متعاقبـة إلى مجموعـة المثيـل تحت تـأثير المركب IHF (Tetrahydro folic acid) ثم تنقل مجموعة المثيل هـذه إلى التميم الأنزيمي B_{12} وبعدها يتحرر الميثان وباشتراك المركب ATP.



شكل (3-21) تكوين الميثان من Co_2 او الميثانول أو الخلات بواسطة بكتيرياب الميثاق.

كمـا تنقـل مكافئـات الاختـزال بفعـل المركب ATP مباشـرة مـن التمـيم الأنزيمي B_{12} إلى مجموعة المثيلية أو الخلات في الحالات التي يكون فيها مصدر كربون الميثان عن الميثانول او الخلات عوضاً عن (CO_2) علماً بـأن THF لا يلعب في هـذه الحالـة دوراً يـذكر (شـكل 3-21). يتضح مـن الـشكل (3-21) الـدور

الأساس لرباعي هدرو حامض الفولك (THF) في الاختمار المنتج للميثان والمستخدم CO_2 بمثابة ركيزة. يوضح الشكل الآتي (3-22) الصيغ النشطة المختلفة لهذا التميم الأنزيمي HCO—THF و CH_2 -THF و CH_3—THF وتحولاتها كما يتضح في التفاعل الأول دورالمركب ATP بوصفه واهباً للطاقة في تفاعل التخليق المحفز بالأنزيم FormyL tetrahydrofolate Synthetase



شكل (3-22) الصيغ النشطة المختلفة لرباعي هدروحامض الفولك THF وتحولاتها ودورها في الاختمار المنتج للميثان. تبتدئ سلسلة التحولات بربط الفورمات بالتميم الانزيمي THF بفعل انزيم Synthetase متخصص

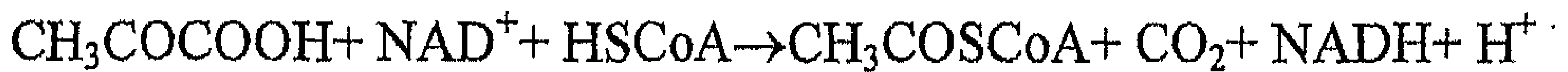
3-1-2 الاختمار الهوائي (التنفس) والتخليق الحيوي:

تكون عملية التنفس أساساً لجميع الاختمارات الهوائية وتعد أهم آلية لإنتاج الطاقة. تتميز الاختمارات الهوائية بنقل مكافئات الاختزال (الكترونات أو ذرات هدروجين) من المركبات العضوية خلال سلسلة من الجزيئات الناقلة إلى اوكسجين الهواء بوصفه متقبلاً نهائياً للالكترونات وتسمى سلسلة نقل الالكترونات بالسلسلة التنفسية وينتج عنها ATP وماء بعملية تسمى الفسفرة التأكسدية.

تكون المركبات الواهبة للالكترونات في الاختمار الهوائي، مركبات وسطية في دورة كريبس Krebs citric acid cycle إلا أن هناك مركبات أخرى تستطيع أن تكون مانحة للالكترونات في أنواع معينة من العمليات التنفسية وكمثال تأكسد الايثانول إلى حامض الخليك الذي يعد مهماً في التكنولوجيا.

3-1-2-1 أكسدة البيروفات في الأيض الهوائي إلى Acetyl CoA

تعد البيروفات جزيئة مركزية في العمليات الأيضية الهوائية ويكون مصيرها الرئيس في التنفس الخلوي الأكسدة إلى Acetyl CoA و CO_2:



$$CH_3COCOOH + NAD^+ + HSCoA \rightarrow CH_3COSCoA + CO_2 + NADH + H^+$$

يتم التفاعل بوجود المعقد متعدد الأنزيمات Pyruvate dehydrogenase complex(ص 321) ويتألف من ثلاث دون وحدات Subunite فعالة لكل منها فعالية أنزيمية متميزة وهي Pyruvate dehydrogenase و Dihydrolipoyl transacetylase و dehydrogenase Dihydrolipyl يوضح الجدول (3-5) الفعاليات الأنزيمية للمعقد في البكتريا E. coli

يشتمل التفاعل الإجمالي (3-88) على عدة خطوات تتطلب تناسقاً دقيقاً بين دون وحدات المعقد ويوضح الشكل 3-23 خطوات التفاعل بالتفصيل.

جدول (3-5): المعقد الأنزيمي **pyruvate dehydrogenase** للبكتريا **E.coli**

Enzyme	Abbreviation	Number of chains	Prosthetic group	Reaction catalyzed
pyruvate dehydrogenase Component	A or E_1	24	TPP	Decarboxylation of pyruvate
Dihydrolipoyl Transacetylase	B or E2	12	Lipoamide	Oxidation of C2 Unit and transfer to CoA
Dihydrolipoyl dehyrogenase	C or E3	12	FAD	Regeneration of the Oxidized form of lipoamide

أ. يتم إزالة الكربوكسيل من البيروفات بفعالية دون الوحدة pyruvate dehydrog- enase المتطلبة للتميم الأنزيمي Thlaimine pyrophesphate (Thiaimine) وينتج عن التفاعل α-Hydroxyethyl- thiamine-pp

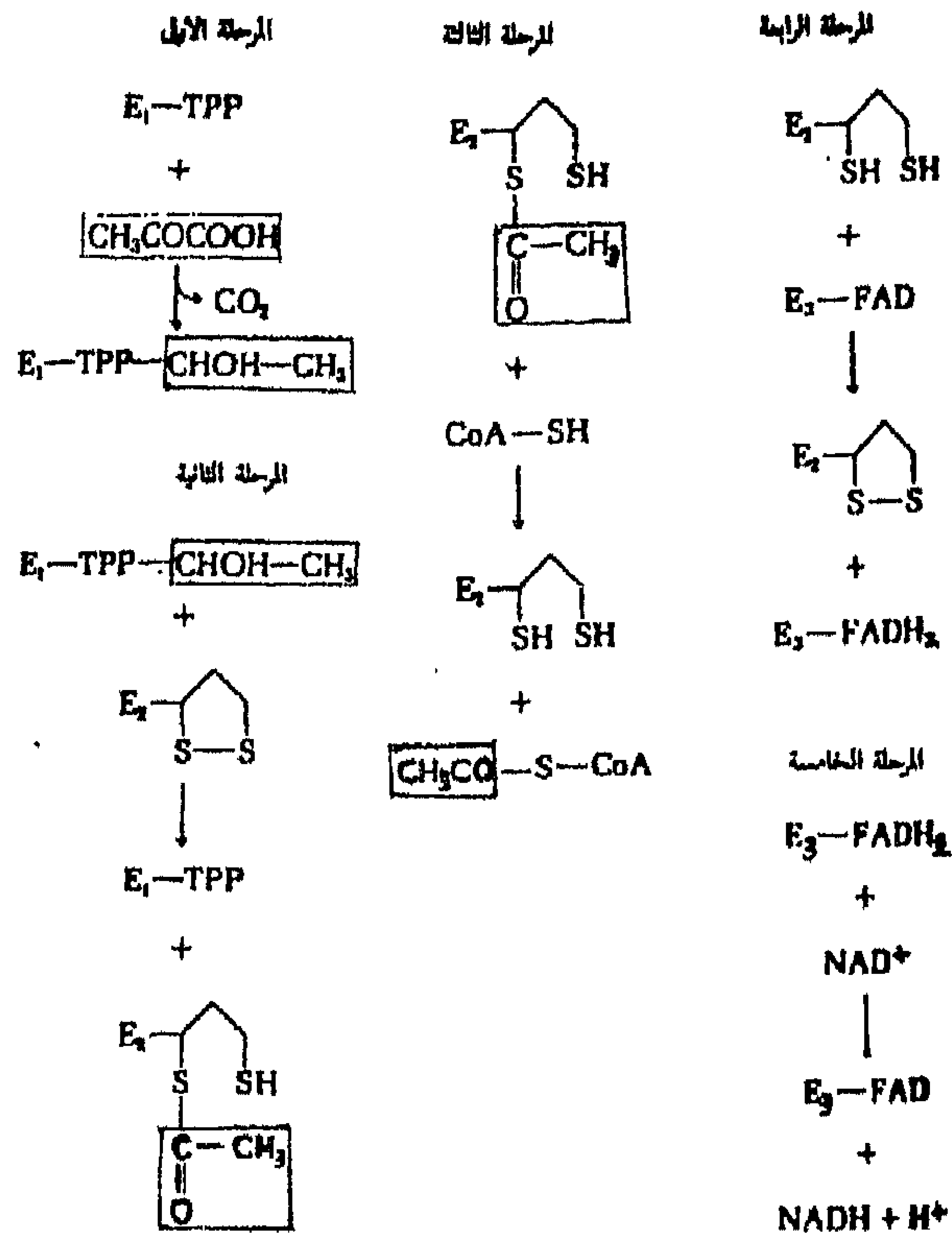
ب. تقوم دون الوحدة Pyruvate dehydrogenase

كذلك بنقل ذرات الهدروجين ومجموعة الاستيل من Thiamine-pp إلى الصيغة المؤكسدة للمجموعة الضميمة لدون الوحدة.

Dihydrolipoyl transacetylase ويتكون نتيجة لذلك استيل ثايو- استر Acetyl thino ester للمجموعة الضميمة المختزلة لدون الوحدة المذكورة (انظر الشكل 3-23).

جـ. تتفاعل جزيئة CoA – SH مع مشتق الاستيل لدون الوحدة dihydrolipoyl transacetylase ويتكون بذلك Acetyl-S-CoA وتصبح المجموعة الضميمة لدون الوحدة المذكورة بصورة مختزلة.

د- تقوم دون الوحدة Dihydrolipoyl dehydrogenase بنقل ذرات الهدروجين من المجموعة الضميمة المختزلة إلى FAD الذي يمثل المجموعة الضميمة لدون الوحدة Dihydrolipoyl dehyrogenase.



E_1= pyruvate dehydrogenase; TPP = thiamine pyrophosphate.
E_2= dihydrolipoyl transacetylase;.
E_3= dihydrolipoyl dehydrogenoase.

حامض البويك lipoic acid المؤكسد

حامض البويك المختزل

شكل (3-23) خطوات التفاعل الاجمالي المحفز بالمعقد الانزيمي

Pyruvate dehydrogenase complex.

هـ- يتم أكسدة $FAD\ H_2$ الناتج في الخطوة السابعة بوجود NAD^+ ودون الوحدة Dihydrolipoyl dehydrogenase. لاحظ انتقال ذرات الهدروجين من $FADH_2$ إلى NAD^+ عكس ما هو معروف عادة.

3-1-2-2 أكسدة المركب Acetyl CoA في دورة حامض الستريك (دورة كريبس) :

تدخل جزيئة المركب Acetyl CoA والناتجة عن فعالية المعقد الأنزيمي dehydrogenase pyruvate على البيروفات- دورة حامض الستريك بارتباطها مع الاوكزالواستات ويمكن كتابة المعادلة الإجمالية للدورة كالآتي:



(89-3).. $\text{Acetyl- CoA} + 3NAD + FAD + GDP + pi + 2H_2O$



$\rightarrow 2\ CO_2 + 3NADH + FADH_2 + GTP + 2H + CoA$

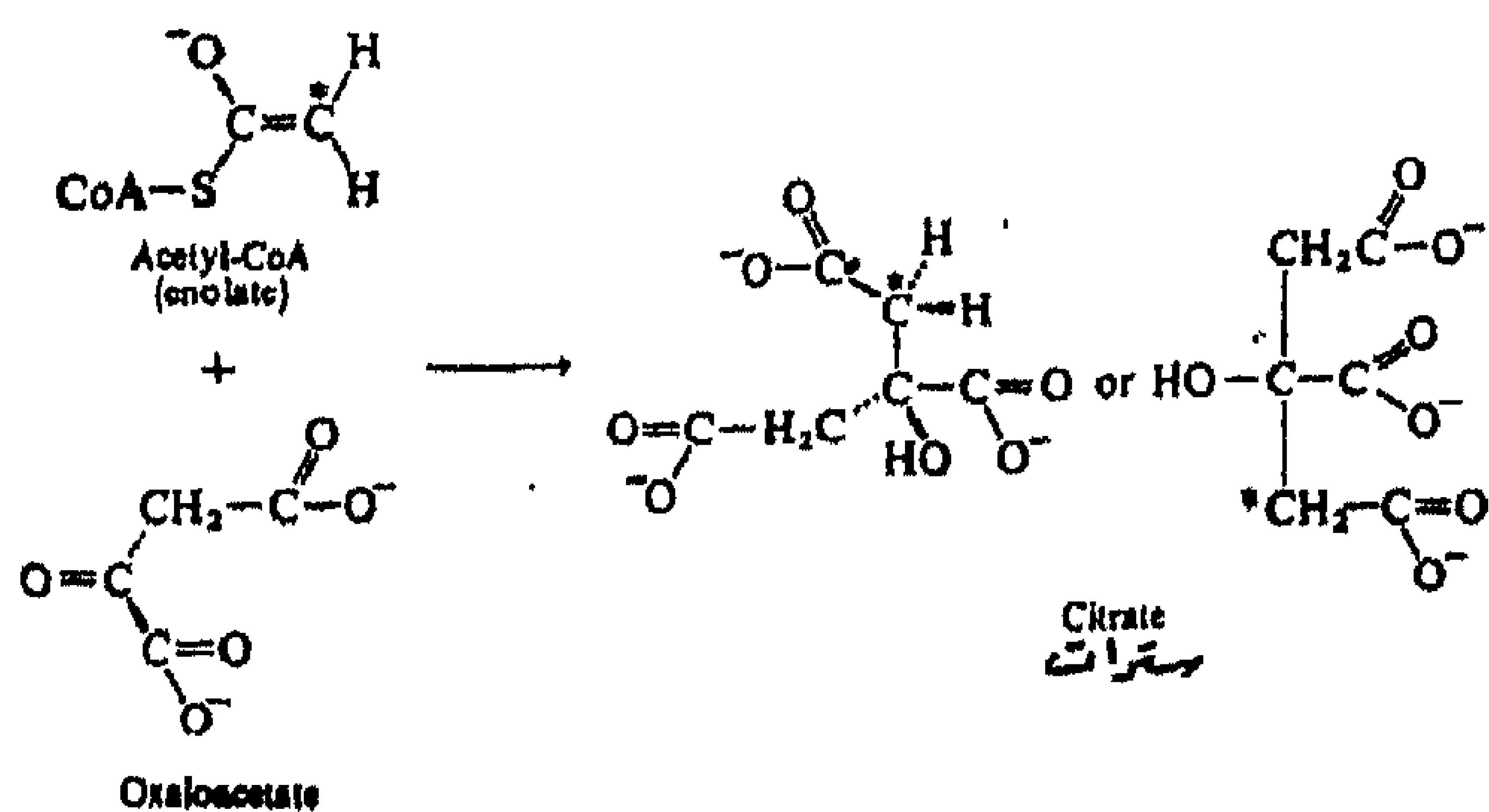
تحصل تفاعلات دورة كريبس في الظروف الهوائية فقط حيث يعاد أكسدة التميمات الإنزيمية المختزلة- والمتكونة خلال الدورة- بدخولها السلسلة التنفسية التي يكون الأوكسجين فيها المتقبل النهائي للالكترونات وينتج عن هذه العملية تثبيت الطاقة بشكل ATP بعملية الفسفرة التأكسدية.

يوضح الشكل (3-24) دورةكريبس (دورة حامض الستريك) وفيما يلي تفاصيل تفاعلات هذه الدورة والأنزيمات المحفزة لها.

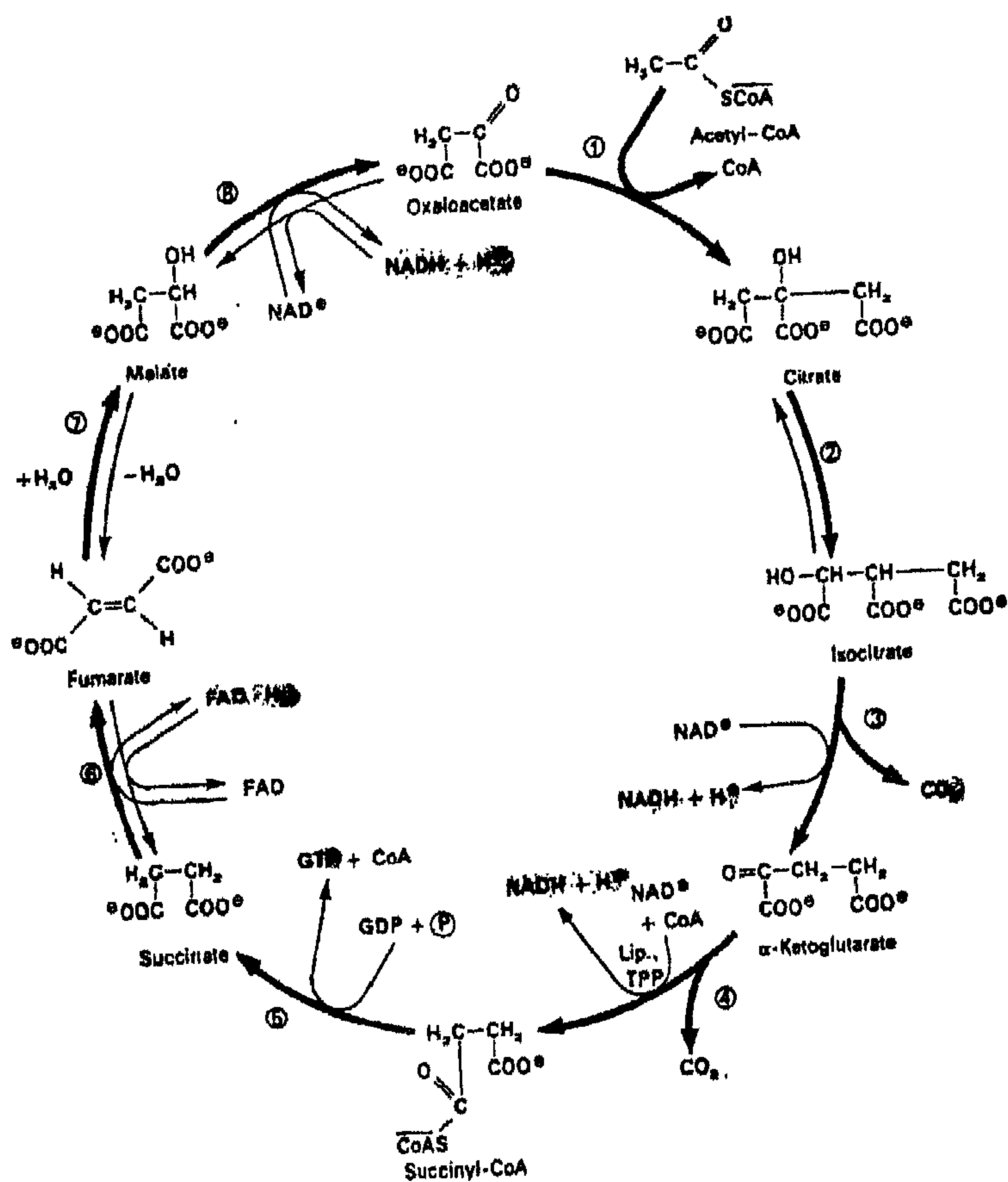
الخطوة الأولى: يتكاثف المركب Acetyl CoA

مع الأوكزالواستات بوجود الأنزيم

Citrate synthase (Citrate- Oxaloacetate lyase EC 4.1.3.7) تتفاعل المجموعة الكيتونية للإوكزالواستات مع المركب Acetyl CoA بتفاعل شبيه بتكثيف الالدول Aldol condensation.



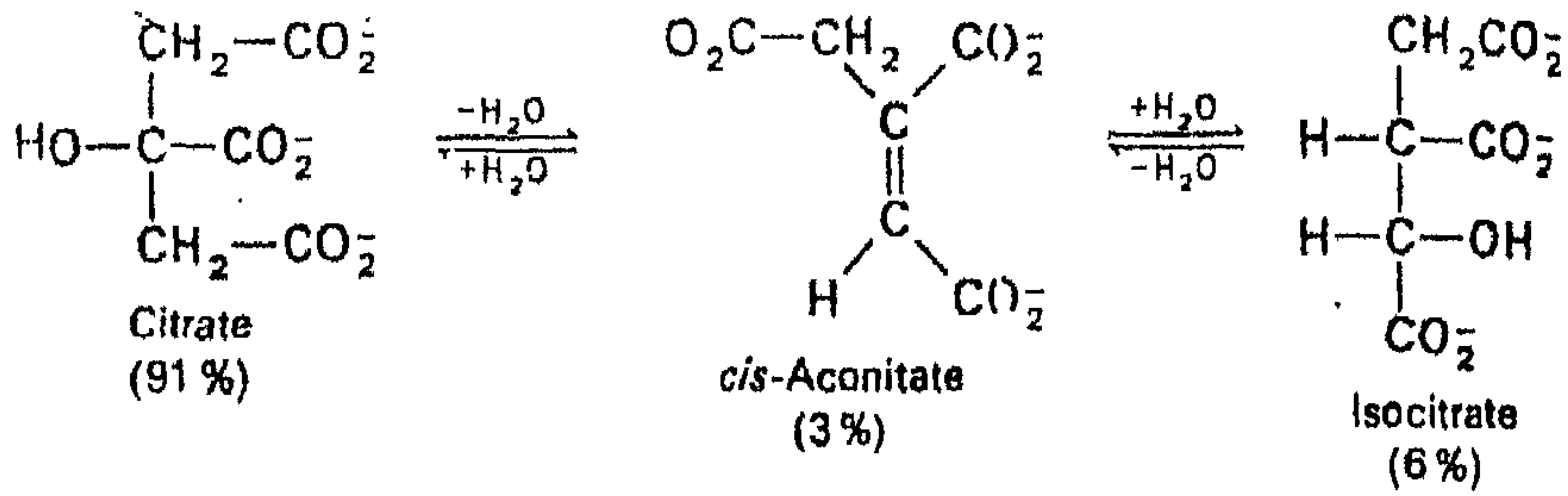
(90-3) ...



شكل (3-24) دورة حامض الستريك (دورة كريبس).

لا يبدي الأنزيم تخصصاً مطلقاً للمركب Acetyl CoA فمثلاً يمكن أن يتفاعل المركب $FH_2C-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\sim SCoA$ FluroacetylCoA مع الأوكزالواستات لتكوين Fluorcitrate.

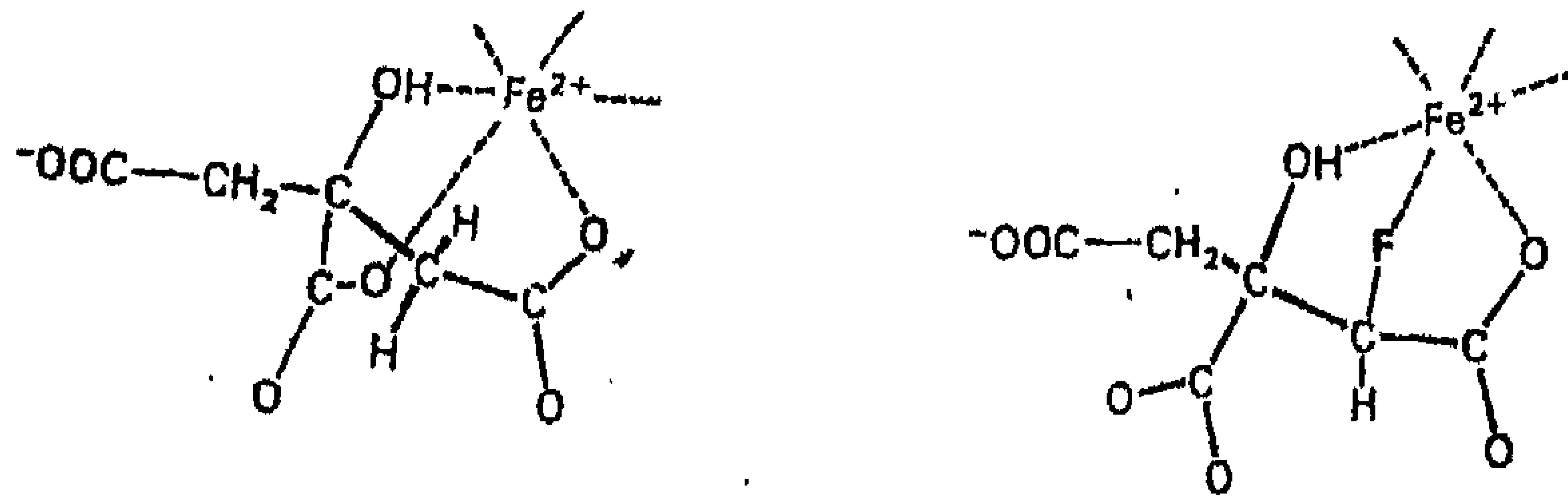
الخطوة الثانية: تتم هذه الخطوة بمساعدة الأنزيم- Citrate (isocitrate) hydro Aconitate hydratase (EC 4.2.1.3) ويشتمل التفاعل تحول السترات إلى ايزوسترات عبر المركب Cis-Aconitate



يحتوي مزيج التفاعل عند الموازنة في pH =7.4. النسب الموضحة في المعادلة أعلاه وهكذا يلاحظ بأن نسبة الايزوسترات قليلة مقارنة بالسترات إلا أن التفاعل يتجه في الخلية نحو إنتاج الايزوسترات بالنظر لأن المركب الأخير يستهلك بسرعة في التفاعلات اللاحقة.

يكون الأنزيم Aconitase ذا تخصص مطلق إذا ما قورن بالأنزيم Citrate synthase وهكذا لا يستطيع أن يعمل على المركب Fluorocitrate وبالحقيقة يكون هذا المركب مثبطاً للأنزيم ويمكن تفسير هذا كما يأتي:

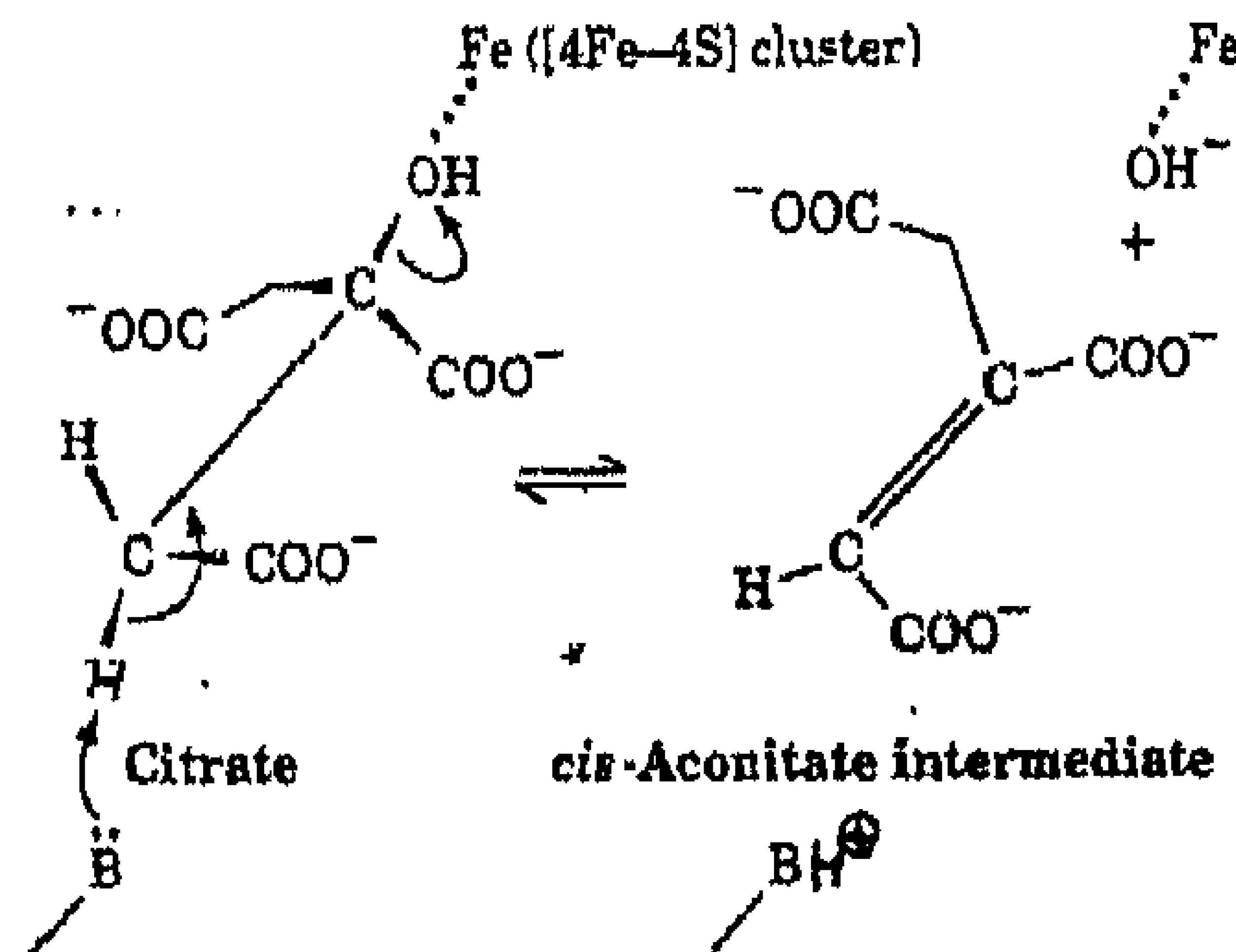
يحتوي الموقع النشط لأنزيم Aconitase على أيون Fe^{2+} الذي يكون خلابة chelate مع أوكسجين مجموعة الهدروكسيل وأوكسجين مجموعتي الكاربوكسيل للسترات (شكل 3-25) وتسمى آلية عمل الأنزيم بآلية عجلة الحديدوز Ferrous wheel mechanism.



شكل (3- 25) النموذج المقترح لارتباط السترات والفلوروسترات في الموقع النشط للانزيم Aconitase.

وعلى العكس يرتبط الفلوروسترات بحيث تكون ذرة الفلور خلابة مع أيون الحديدوز أن الكهرسلبية Electronegativity العالية للفلور تجعله يرتبط بقوة مع Fe^{2+} وهذا يؤدي إلى أنزيم مثبط.

يساعد أنزيم Aconitase التفاعل العكسي المزامر للسترات والايسوسترات، ويكون المركب cis-aconitate مركباً وسطياً في هذا التفاعل يلزم لتكوين المركب الوسطي cis-aconitate إزالة جزيئة من الماء (dehydroation) وذلك بمساعدة الجزء القاعدي للأنزيم (B̈) حيث يسلب الأنزيم بواسطة هذا الجزء بروتوناً من الكربون رقم (2) للسترات، ويتبع ذلك فقدان مجموعة هيدروكسيل (OH) من الكربون رقم (3). هذا علماً بأن الأنزيم السالف الذكر يحتوي في تركيبه على مجاميع من (Fe-4S4) والتي يحتاجها الأنزيم لنشاطه التحفيزي (شكل 3-26).

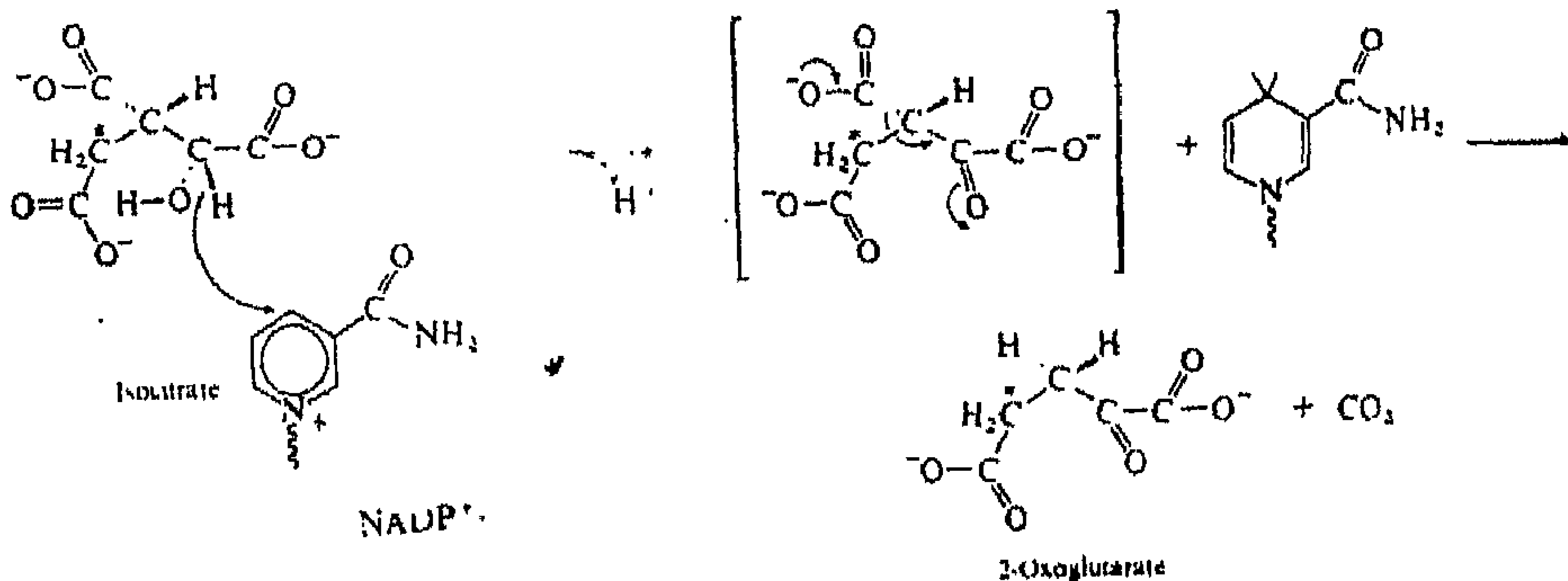


شكل 3-26

الخطـــوة الثالثـــة: تحـــول الايزوســـترات إلى الفـــا- كيتوكلـــوترات α-Ketoglutrate وتتم بمساعدة الأنـزيم Isocitrate dehdrogenasel threo-DS- Isocitrate: NAD oxidoreductase(decarboxylating)

يوجـد لهـذا الأنــزيم ايزوانزيمـان أحـدهما ذو خـصوصية للمركـب NAD والآخر متخصص للمركب NADP ويعد الأول أكثر أهمية في إنتاج الطاقة من الثاني حيث تنقل ذرات الهدروجين من NADH عبر السلسلة التنفسية ويتم نتيجة لذلك تكوين ATP. يثبط عمل هذا الأنزيم (المتخصص للمركب NAD). بوجود تركيزات عالية نسبيا من ATP وينشط بوجود ADP. أما الأيزوانـزيم المتخصص للمركب NADP فذو فائدة في عمليات التخليق الحيوي حيث يستخدم التميم الأنزيمي المختزل NADPH مصدراً لمكافئات الاختزال في هذه العمليات. يحتاج كلا الأنزيمين إلى وجود Mg^{+2} أو Mn^{2+} بوصفها منشطات.

تتم عملية تحول الايزوسترات إلى الفا- كيتوكلوترات على مرحلتين: ففي المرحلـــة الأولى تـــتم إزالـــة ذرتـــي هيـــدروجين وتتحـــول الايرزوســـترات إلى اوكزالوســكـــسنات، وفي المرحلـــة الثانيـــة تـــتم إزالـــة الكربوكـــسيل مـــن السكسنات لتكوين الفا- كيتوكلوترات وتسهل إزالة الكربوكسيل لوجود مجموعة كيتو مجاورة.



(91-3) ...

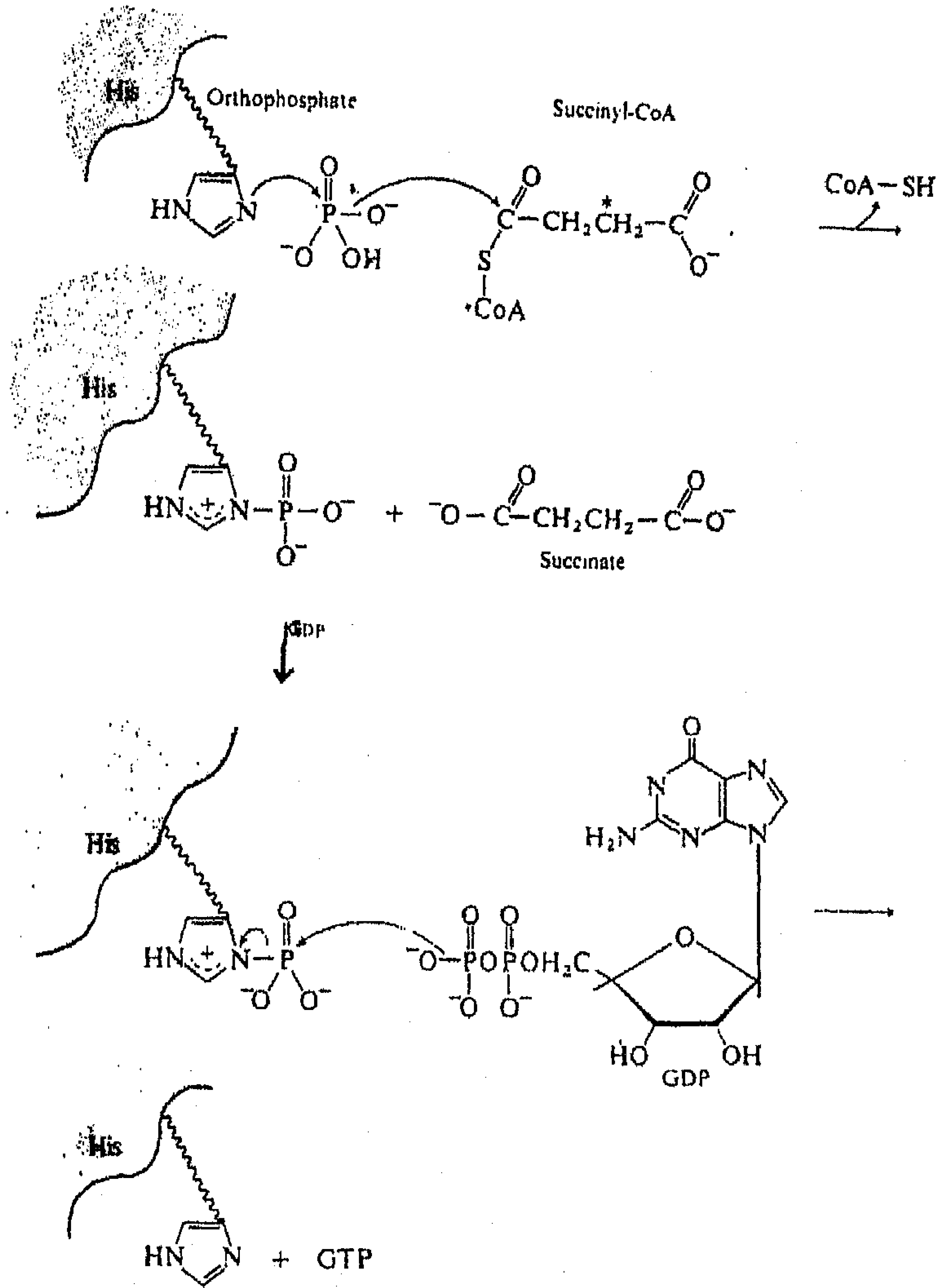
يلعب مثبط الأنزيم Isocitate deydrogenase وكذلك Aconitase دورا كبيرا في إنتاج حامض الستريك في الصناعة عن طريق أنواع من الفطر مثل Aspergillus niger

يعد المركب Hexacyanoferrate (II). لذا فأن لهذين المثبطين دورا كبيرا في تكنولوجيا اختمار حامض الستريك.

الخطوة الرابعة: إزالة الكربوكسيل التأكسدية من المركب -الفا- كيتو كلوترات وتحويله إلى Succinyl CoA. تطابق آلية هذا التفاعل وكذلك تميماته الأنزيمية، آلية تحول حامض البيروفك إلى Acetyl CoA. يحدث التفاعل بواسطة المعقد متعدد الأنزيمات الذي يتكون من ثلاث وحدات فعالية ذات فعاليات أنزيمية مختلفة وهي α-Ketoglutarate و dehydrogenaseeate و Dihydrolipoyl transacetylase و Dihydrolipoyl dehydrogenase

الخطوة الخامسة: يتم في هذه الخطوة (فسفرة على مستوى الركيزة) حيث يتم تخليق جزيئة GTP في الوقت الذي يتحول فيه Succinyl CoA إلى Succinate. يشتمل هذا التفاعل – المحفز بالأنزيم Succinyl CoA على خطوة وسطية يكون فيها الأنزيم بصيغة مفسفرة Phosphoryl enzme يمكن عزلها. ترتبط مجموعة الفسفات بنتروجين جزء الاميدازول لوحده الهستديل في الموقع النشط لدون الوحدة الصغيرة. ولقد امكن معرفة حقيقة هذا الإرتباط على أساس الظروف التي تحصل فيها إزالة الفسفرة. تعاني وحدات الهستديل المفسفرة إزالة مجموعة الفسفات منها بوجود اعيارى حامض الكبريتيك في 100°م مدة دقيقتين أما فسفات الاسيل Acyl phosphate وكمثال وحدة الكلوتاميل المفسفرة، فتعاني من إزالة مجموعة الفسفات منها عند تعريضها إلى 0.03 مولار هدروكسيد الصوديوم مدة 10 دقائق. ومن ناحية أخرى يمكن إزالة فسفرة الوحدات: Phosphorylseryl: أو phosphorylthreonyl عند معاملتها مدة 15 دقيقة في 100°م مع أعياري هدروكسيد البوتاسيوم.

لقد تبين كذلك بأنه نتيجة للتفاعل، يتم نقل ذرة أوكسجين من الفسفات إلى السكنسات، وبناء على هذه المعلومات وغيرها، تم اقتراح آلية التفاعل الموضحة في شكل (3-27).



شكل (3-27) آلية تحول Succimyl CoA إلى Succinate بوجود الانزيم Succinyl CoA Synthetase. لاحظ تكوين انزيم مفسفر في جزء الأميدازول لثمالة الهستديل في الموقع النشط للانزيم ويتم بعدئذ نقل مجموعة الفسفات هذه إلى GDP لتكوين GTP.



يمكن للGTP الناتج في الخطوة الخامسة أن يتحول إلى ATP:

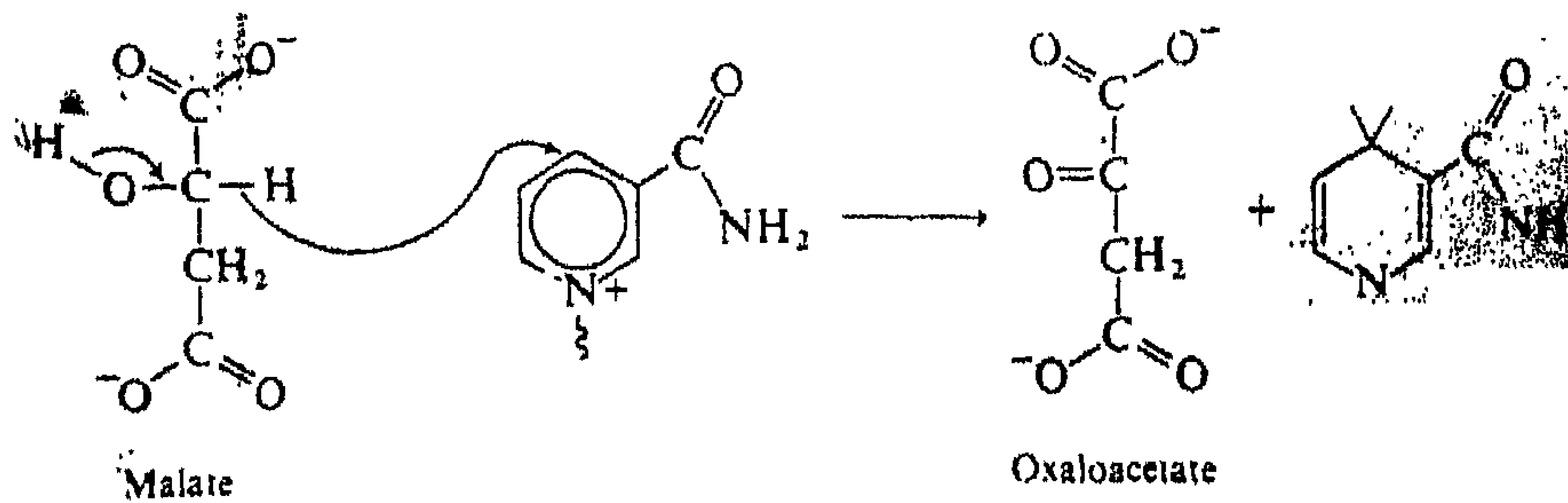
$$GTP + ADP \rightleftarrows ATP + GDP \qquad (92-3) ...$$

بوجود الأنزيم Nucleoside diphosphokinase.

الخطوة السادسة: تزال ذرتا هيدروجين من السكنسات وتتحول بذلك إلى فيومارات بواسطة الأنزيم Sucinate (acceptor)- {Succinate- dehydrogenase Oxidoreductdse} ويعمل المركب FAD المرتبط بالأنزيم بمثابة المجموعة الضميمة حيث تتصل الحلقة Isoaloxazine بصميم الأنزيم Apoprotein بآصرة تساهمية يحتوي الأنزيم كذلك على أربع ذرات Fe لكل مجموعة فلافين. ويمكن تثبيط هذا الأنزيم تنافسيا عن طريق حامض المالونك ($HOCO - CH_2 - COOH$).

الخطوة السابعة: تتحول الفيومارات إلى مالات بواسطة الأنزيم -Malate- L [Hydro-lasy Fumarate hydratase] ويتضح من التسمية إضافة مكونات الماء إلى الفيومارات. للأنزيم تخصص مطلق لكل من حامض الفيوماريك وعند التوازن في PH=0.7 يحتوي مزيج التفاعل 82٪ حامض المالك.

الخطوة الثامنة: يمثل تحول المالات إلى الأوكزالواستات التفاعل الأخير في دورة كريبس. تتم العملية بالأنزيم Malate -L-Malate:NAD oxidoreduc dehydrogenase tase:



(93-3) ...

تعيد الدورة نفسها من جديد بتفاعل الاوكزالواستات مع جزيئة أخرى Acctyl CoA ليعاد أكسدتها وتحولها إلى جزيئتين CO_2 مع توليد جزيئة GTP وثلاث جزيئات NADH وجزيئة $FADH_2$.

تدخل هذه التميمات الأنزيمية المختزلة السلسلة التنفسية وينتج عن أكسدة كل جزيئة NADH ثلاث جزيئات ATP بينما تؤدي أكسدة $FADH_2$ إلى توليد جزيئتي ATP. وبذلك يؤدي أكسدة Acetyl CoA في دورة تامة إلى توليد 12 جزيئة عالية الطاقة وهي 11 جزيئة ATP وجزيئة GTP.

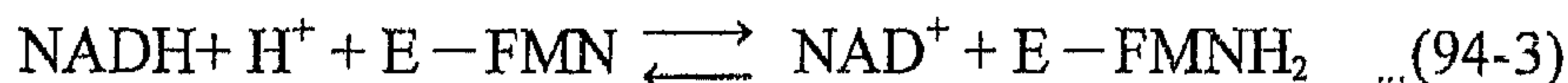
3-1-2-3 السلسلة التنفسية والفسفرة التأكسدية :

يوضح الشكل 3-28 مراحل التنفس الخلوي. يتم في المرحلة الأولى تحول البيروفات والأحماض الأمينية والدهنية إلى Acetyl CoA وفي المرحلة الثانية يتم أكسدة المركب Acetyl CoA في دورة حامض السترك إلى CO_2 مع توليد ذرات هيدروجين غنية بالطاقة (بشكل NADH و $FADH_2$). وفي المرحلة الثالثة للتنفس الخلوي تنفصل ذرات الهدروجين إلى بروتونات والكترونات غنية بالطاقة، تنقل عبر سلسلة من الجزيئات الناقلة للالكترونات (السلسلة التنفسية وتسمى أيضاً سلسلة نقل الألكترونات) إلى الأوكسجين الجزيئي وتختزله ويؤدي ذلك إلى توليد الماء.خلال عملية نقل الإلكترونات هذه، تتحرر كمية كبيرة من الطاقة يتم حفظ جزء كبير منها بصيغة ATP وبعملية تسمى الفسفرة التأكسدية.

يمكن توضيح السلسلة التنفسية في جزيئين: يتم في الجزء الأول منها مراحل نقل الهيدروجين وحيث تنقل أزواج من الإلكترونات والبروتونات متزامنة، وأما في الجزء الثاني فيتم نقل الإلكترونات فقط.

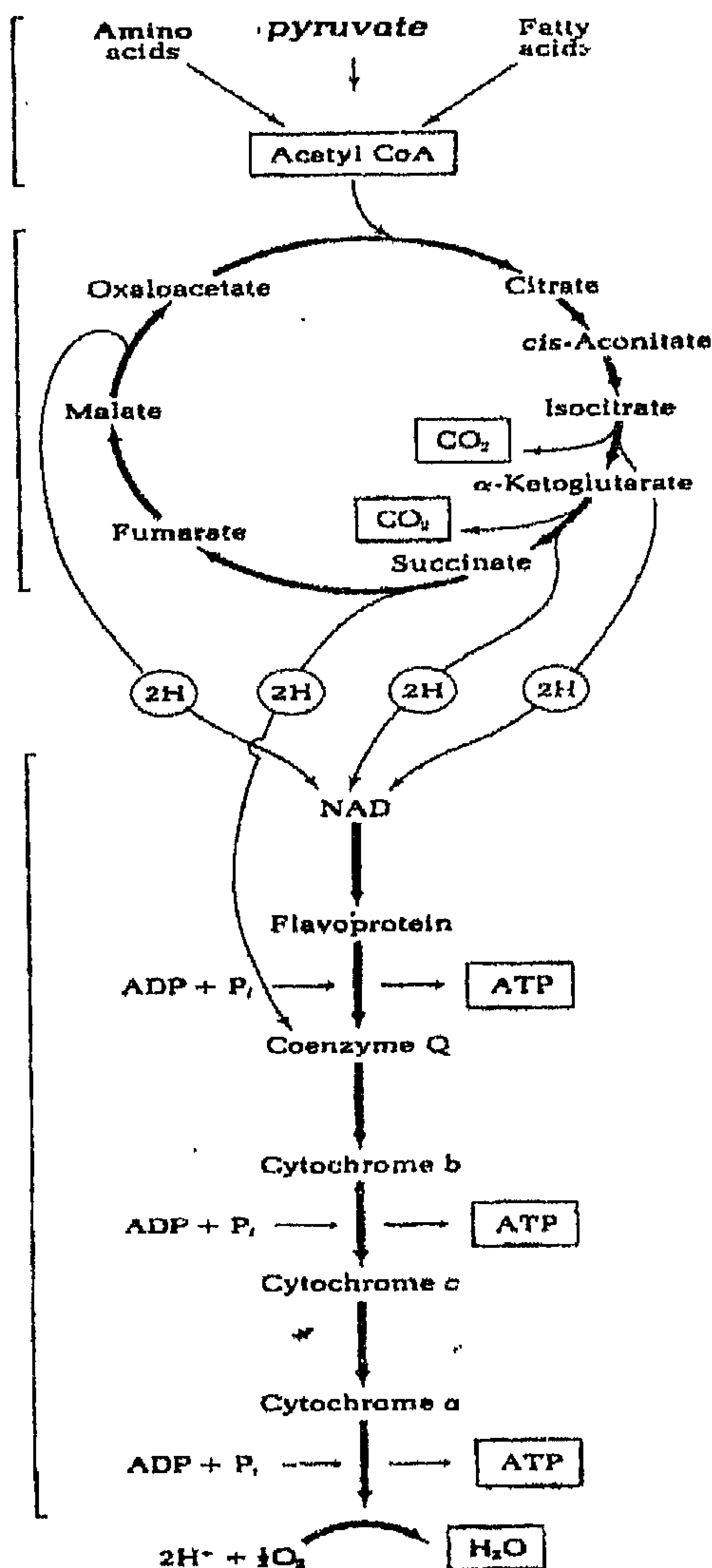
إزالة الهدروجين من المركب NADH بواسطة الأنزيم NADH dehydrogenase :

يشكل NADH ركيزة للمعقد الأنزيمي NADH dehydrogenase وفي هذا التفاعل يتم نقل زوج من مكافئات الاختزال من NADH إلى المجموعة الضميمة [FMN -(Flavin monon)(uleotide:



$$NADH + H^{+} + E - FMN \rightleftharpoons NAD^{+} + E - FMNH_2 \quad ...(94\text{-}3)$$

(94 -3) ....



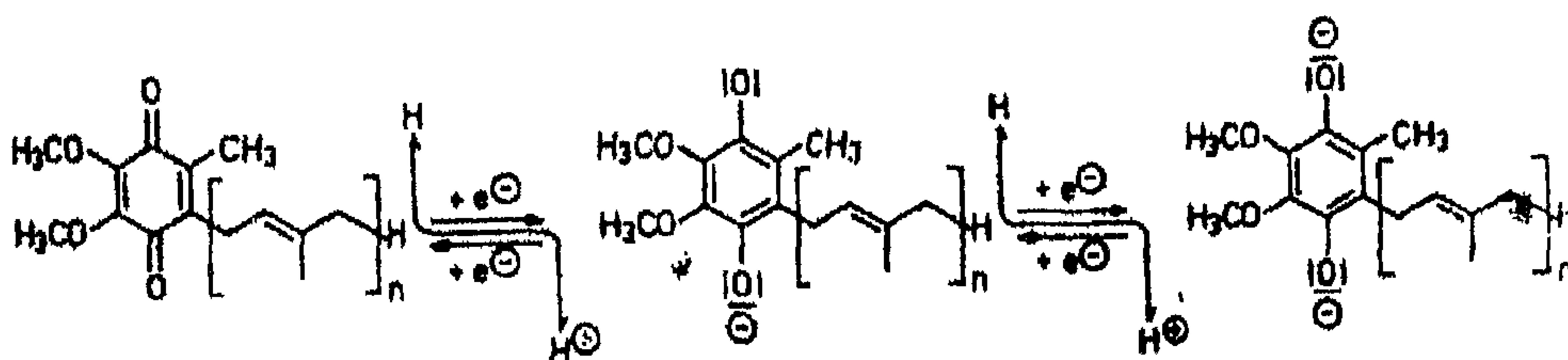
شكل (3-28) مراحل التنفس الخلوي. المرحلة الأولى: تكوين Acetyl CoA المرحلة الثانية: دورة حامض السترك، المرحلة الثالثة: انتقال الإلكترونات في السلسلة التنفسية والفسفرة التأكسدية: يعطي كل زوج لذارت الهدورجين الذي يدخل السلسلة بشكل NADH، 3 جزيئات ATP.

إضافة إلى المجموعة FMN، يحتوي الأنزيم NADH dehydrogenase على عدة ذرات حديد لاهيمي Nonheme iron تعاني تحولا رجوعيا بين Fe (II) و Fe(III) وبذلك يكون بالإمكان نقل مكافئات الاختزال من المجموعة الضميمة $FMNH_2$ إلى الجزيئة اللاحقة الناقلة للالكترونات في السلسلة وهي اليوبكوينون. يسمى المعقد المتكون من فعالية NADH dehydrogenase ومراكز الحديد- الكبريت (الحاوية على الحديد اللاهيمي) باسم NADH- ubiquinone reductase.

يتم تحرير كمية كبيرة من الطاقة الحرة نتيجة إزالة الهيدروجين بواسطة NADH Dehydrogenase وتخزن الخلية جزءا من هذه الطاقة بازواج التفاعل المطلق للطاقة Exergonic reaction مع فسفرة المركب ADP.

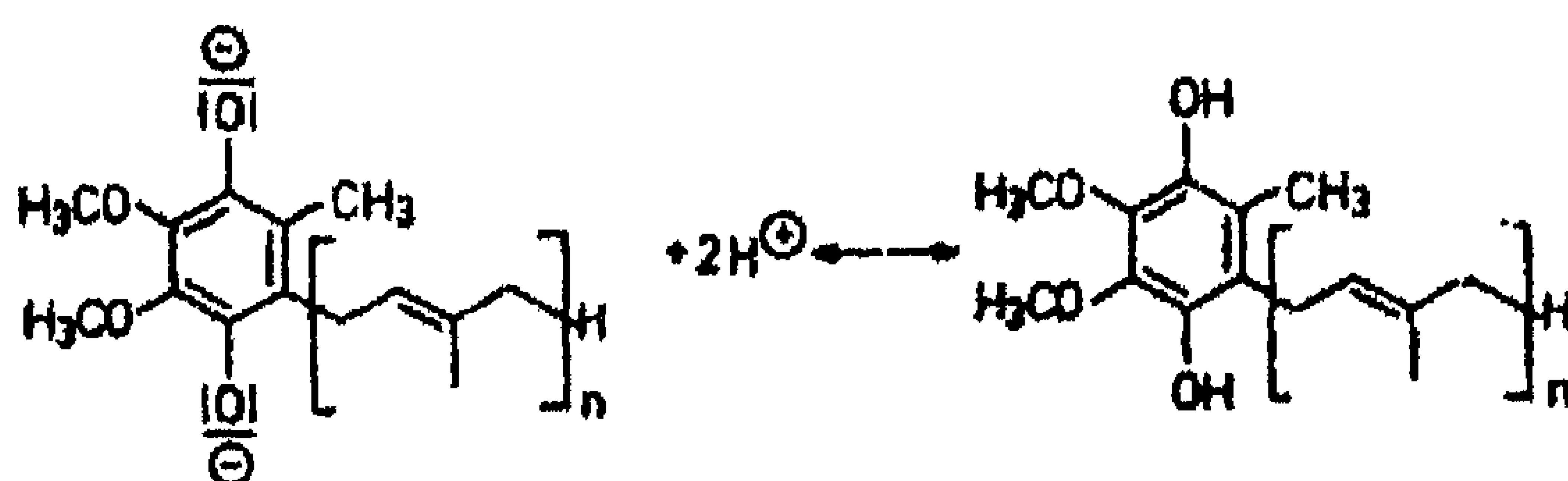
اليوبكوينون (التميم الأنزيمي Q) مستقبلا لمكافئات الإختزال من التميمات الأنزيمية الفلافينية المختزلة.

عندما يهب الأنزيم NADH dehydrogenase ($E\text{-}FMNH_2$) مكافئات الاختزال من خلال مراكز الحديد- كبريت إلى اليوبكوينون، يختزل الأخير إلى ubiquinol أي (QH_2) يمكن التعبير عن نقل ذرات الهيدروجين إلى اليوبكوينون كنقل الكترونين كالآتي:



(95-3) ...

يتكون في المرحلة الوسطية المركب Semiquinone الذي يتحول فيما بعد إلى ubihydroquinone. يمكن تحول المركب ubihydroquinoue ذي الشحنة السالبة إلى الشكل غير المتأين نتيجة لإكتسابه بروتونات:



(96-3) ...

يستلم اليوبكوينون مكافئات الإختزال كذلك من مزيلات الهيدروجين Dehydrogenases الأخرى المرتبطة الفلافين وكمثال Succinate dehydrogenase و Fatty acy CoA dehydrogenase

ترتبط بكربون رقم 6 لحلقة الكوينون في اليوبكوينون سلسلة أيزوبرينويدية وهي بوليمر مكون من وحدات الايزوبروبين (2-مثيل-2 - بيوتين). ويتراوح عدد الوحدات من 6-10 تبعاً لوجودها في الخمائر أو الأحياء المجهرية أو الفقريات فهي 7-10 في الطحالب و 9-10 في الفطريات Fungi و 6-9 في الخمائر و9 في الكرثديا والتريبانوسوما ولقد وجدت مؤخرة رسام M.B.Rassam وجماعتها (1988) بأن طفيليات اللشمانيا المسببة لمرض الحمى السوداء في العراق تحتوي على يوبكوينون من نوع Uqq أي أن السلسلة الجانبية تحوى 9 وحدات ايزوبرين.

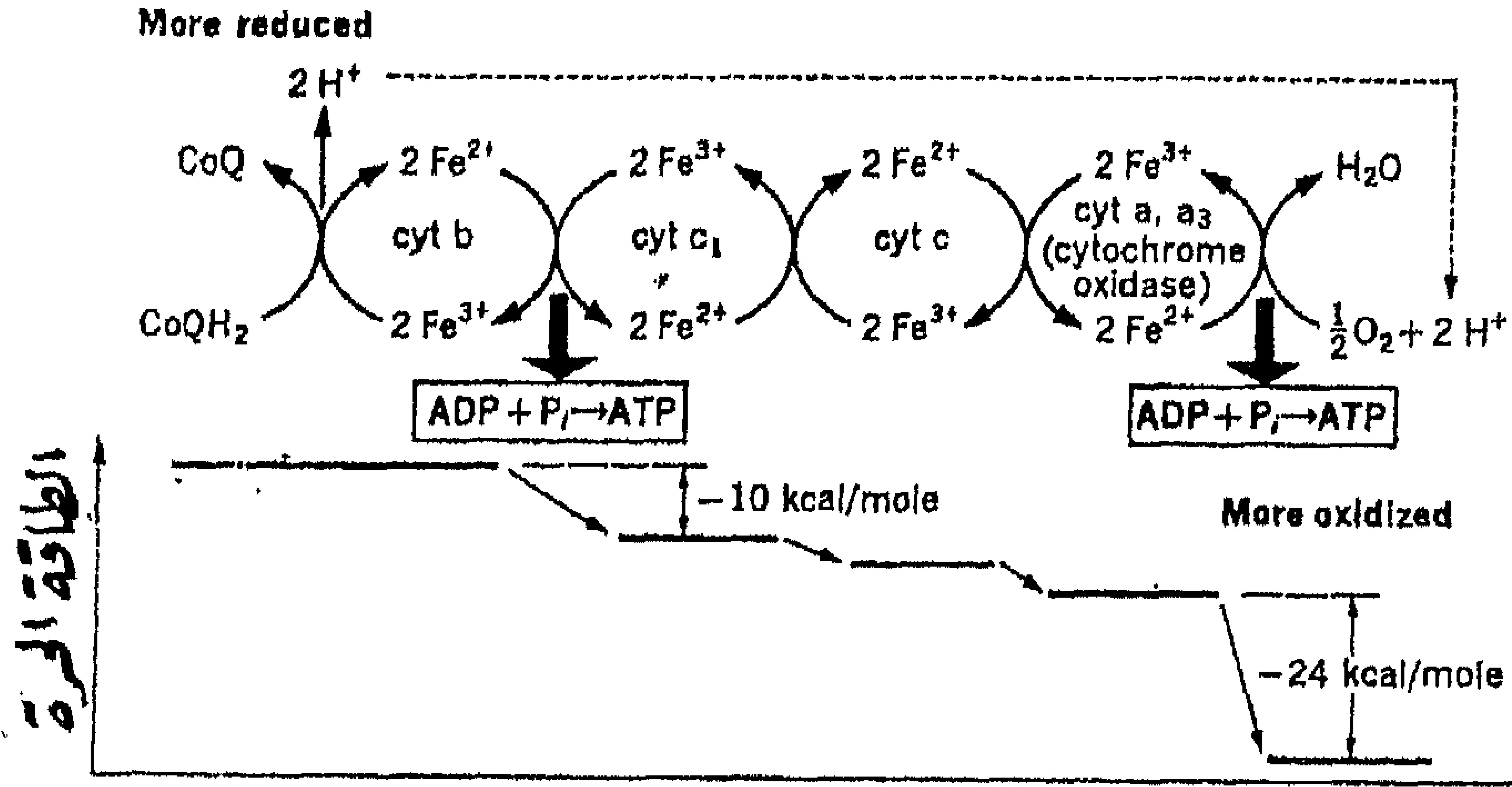
نظام السايتوكرومات لنقل الإلكترونات:

تنتقل الإلكترونات من اليوبكوينون المختزل إلى سلسلة السايتوكرومات وهي سايتوكروم b وسايتوكروم C_1 وسايتوكروم C وسايتوكروم a_3 و a على التوالي.

السايتوكرومات بروتينات هيمية تختلف بخواص أكسدتها الرجوعية Redox properties يتضح من الجدول (3-5) بأن محصلة التغير في جهد الإختزال القياسي تعادل 0.22 فولت عند الإنتقال من سايوكروم b إلى سايتوكروم (a,a_3) وهذا يعادل 10.1 كيلو سعرة لكل مول. وبما أن المجموعة الضميمة لجميع السايتوكرومات ذات أساس واحد وهو النظام Fe (III)Fe (II) لمجموعة الهيم فإن الجزء البروتيني للسايتوكروم الذي يختلف من سايتوكروم لآخر في تسلسله من الأحماض الأمينية وارتباطه أو تأثره مع مجموعة الهيم يخلق محيطاً لمجموعة الهيم مختلفاً من سايتوكروم لآخر بحيث تختلف معه قيم جهود الإختزال القياسية (E). يوضح الشكل (3-29) نظام السايتوكرومات ومواقع تكوين المركب ATP(بالفسفرة التأكسدية).

جدول 3-5 الجزيئات الناقلة للإلكترونات في السلسلة التنفسية وجهود اختزالها القياسية.

Protein البروتين	Prosthetic group المجموعة الضميمة	Number of electrons transferred عدد الإلكترونات المنتقلة	(E. (V
NADH dehydrogenase	FMNNHI	2	0.11-
Coenzyme Q (not a protein)	Quinone	2	0.10+
Cytochrome b	Heme	1	0.06+
Cytochrome C1	Heme	1	0.22+
Cytochrome c	Heme	1	0.25+
Cytochrome $a.a^3$	Heme	1	0.28+
(Oxygen)	------	4	0.28+



شكل (3-29) نظام السايتوكورمات ومواقع تكوين المركب ATP (الفسفرة التأكسدية).

تتميز السايتوكرومات بأطياف ذات قمم امتصاص خصوصية للسايتوكروم في المنطقة المرئية من الطيف الشمسي. وبالنظر لوجود سايتوكروم C بصورة ذائبة دون غيره من السايتوكرومات فلقد أمكن عزله وتشخيصه.

يظهر سايتوكروم C المختزل طيف امتصاص ذي قمة مميزة لهذا النوع من السايتوكرومات عند 550 نانوميتر للبكتريا Nitrosomonas curopaca و 555 نانوميتر لطفيليات الكرثديا والتريبانوسوما وجدت رسام وداود Rassam & Dawood عام 1986 بأن طفيليات الشمانيا تحوي سايتوكروم C ذي قمة عند 555 نانوميتر وسمي Cyt C^{555}.

تجدر الإشارة إلى أن آخر سايتوكروم في السلسلة وهو سايتوكروم (a,a^3) أو ما يسمى اوكسداز السايتوكروم Cytochrome oxidase يختلف عن بقية السايتوكرومات احتوائه إضافة إلى مجاميع الهيم على ذرات نحاس (بنسبة 1:1

هيم: نحاس). يعاني النحاس كذلك من أكسدة رجوعية (II) CU (I) –Cu خلال انتقال الإلكترونات إلى المستقبل النهائي في السلسلة وهوالأوكسجين الجزيئي.

الفسفرة التأكسدية:

اوضحنا فيما تقدم وجود ثلاثة مواقع لحفظ الطاقة بشكل ATP خلال مرور زوج من الإلكترونات في السلسلة التنفسية (شكل 3–28)، والسبب يعود إلى أن التغير القياسي في الطاقة الحرة (AG) الناتج عن انتقال الزوج الإلكتروني في ذلك الموقع أكثر مما يكفي لتكوين جزيئة ATP(شكل 3–30). ترتبط AG بقيم AE بالعلاقة الآتية:

AG= nFAE

حيث تقدر AG بالسعرات

n= عدد الإلكترونات المنتقلة

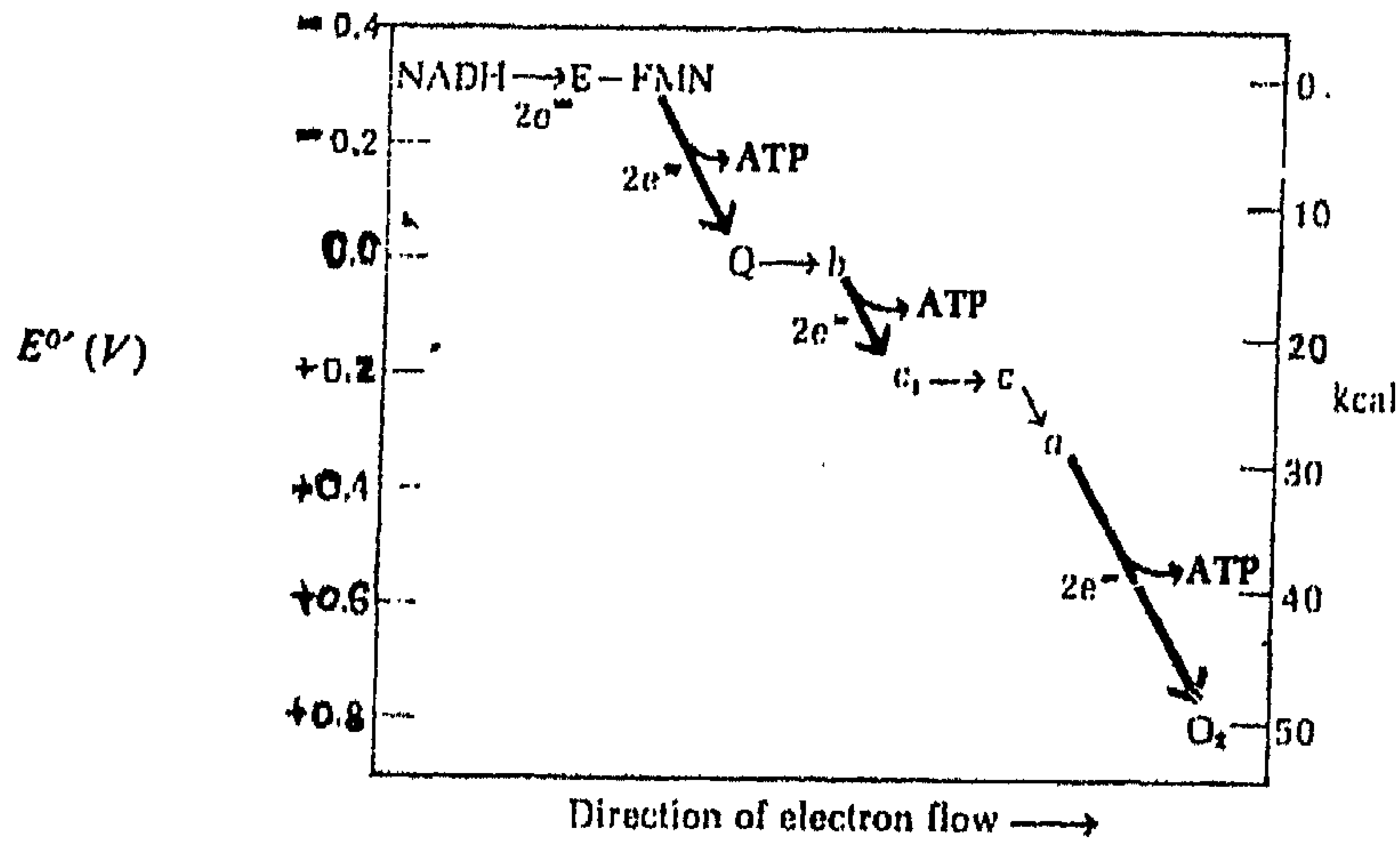
F= ثابت فرداي ويعادل 23.62 سعرة/فولت. مول

AE= الفرق بين الجهد القياسي للنظام الواهب للإلكترونات والنظام المتقبل لها.

ويقصد بالظروف القياسية تركيز 1 مولار لكل من المكونات ودرجة حرارة 25°م ورقم هيدروجيني (7).

يمكن حساب التغير القياسي في الطاقة الحرة الناتج عن انتقال زوج الكتروني من المزدوجة +NADH /NAD(E= 0.32 فولت) إلى المزدوجة $H_2O/\frac{1}{2}O_2$ (E°'= 0.82 فولت) كما يأتي:

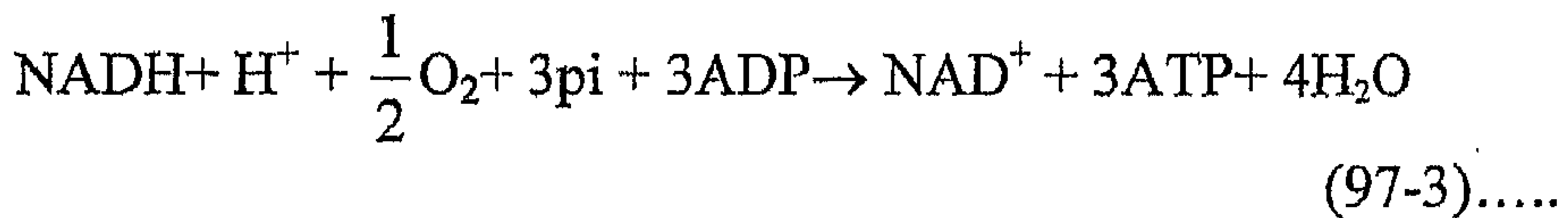
$AG^{o'}$= –2(23.62) [0.82– (–0.32)] = – 52.6 كيلو سعرة.



شكل (3-30) اتجاه جريان الإلكترونات في السلسلة التنفسية وعلاقات جهود الاختزال القياسية E^{o1} والتغير القياسي في الطاقة الحرة (ΔG^{o1}) نتيجة لجريان الالكترونات.

إن مقدار 52.6 كيلو سعرة ناتجة عن انتقال زوج الكتروني من NADH إلى الأوكسجين في الظروف القياسية أكثر مما يكفي لتخليق ثلاث جزيئات ATP حيث يتطلب هذا 3 × 7.3= 21.9 كيلو سعرة.

إن الزوج الإلكتروني الصادر عن مزيلات الهيدروجين Dehydrogenases المرتبطة بالتميم NAD، ينتقل خلال مواقع حفظ الطاقة الثلاثة وبذلك، يؤدي إلى تكوين 3 جزيئات ATP:



$$NADH + H^{+} + \frac{1}{2}O_2 + 3pi + 3ADP \rightarrow NAD^{+} + 3ATP + 4H_2O$$

(97-3).....

إلا أنه عند إزالة الهدروجين من السكنسات بمزيلات الهدروجين المرتبطة الفلافينات، تتكون فقط جزيئتا ATP لكل زوج الكتروني من الفلافين إلى

اليوبكوينون وهذا يعني دخول السلسلة في موقع ما بعد الموقع الأول لحفظ الطاقة (انظر شكل 3-28).

وأخيراً يطلق مصطلح الفسفرة التأكسدية على عملية تكوين المركب ATP من ADP و pi والمرتبطة بإنتقال الإلكترونات في السلسلة التنفسية وتتم بفعل الأنزيم ATP synthetase. وهذه تختلف عن التكوين المباشر للمركب ATP بالفسفرة على مستوى الركيزة التي تم ذكر أمثلة لها في تحلل السكر Glycolysis وفي التفاعل المنتج للسكنسات في دورة حامض الستريك.

3-1-2-4 حساب الطاقة الناتجة بشكل ATP بالتنفس المعتمد على الكلوكوز:

يمكن حساب عدد لجزيئات الATP الناتجة عن أكسدة الكلوكوز كلياً إلى CO_2 وماء كما في الجدول (3-6). يتضح من الجدول تكوين جزيئتي ATP في مسلك تحلل السكر (Glycolysis أو EMP) بالفسفرة على مستوى الركيزة وست جزيئات بالفسفرة التأكسدية نتيجة أكسدة جزيئتي NADH هوائياً. تكون الفسفرة التأكسدية مصدر جميع جزيئات المركب ATP المتكونة لاحقاً عند أكسدة البيروفات إلى Acetyl CoA وعند أكسدة الأخير في دوره حامض الستريك بإستثناء جزيئتي ATP تتكونان بالفسفرة على مستوى الركيزة عند تكون السكسنات وهكذا ينتج عن أكسدة جزيئة كلوكوز 38 جزيئة ATP.

جدول 3-6 عدد جزيئات المركب ATP الناتجة عن تحلل السكر Glycolysis والتنفس لكل جزيئة كلوكوز.

التفاعل Reaction	التميم الأنزيم المختزل Reduced) (conezyme	عدد جزيئات (ATP) المتكونة التأكسدية	ATP المتكون بالفسفرة على مستوى الركيزة
(Glycolysis (aerobic	2NADH	6	2
2pyruvate_ 2 acetyl CoA	2NADH	6	
2isocitrate _ 2α_ ketoglutarate	2NADH	6	
2α- ketoglutarate_ 2 succinate	2NADH	6	2
2succinate__ 2 fumarate	$2FADH_2$	4	
2malate _ 2 oxaloacetate	2NADH	6	

Total ATP generated 38 ATP/glucose

جزيئات المركبATP الاجمالية

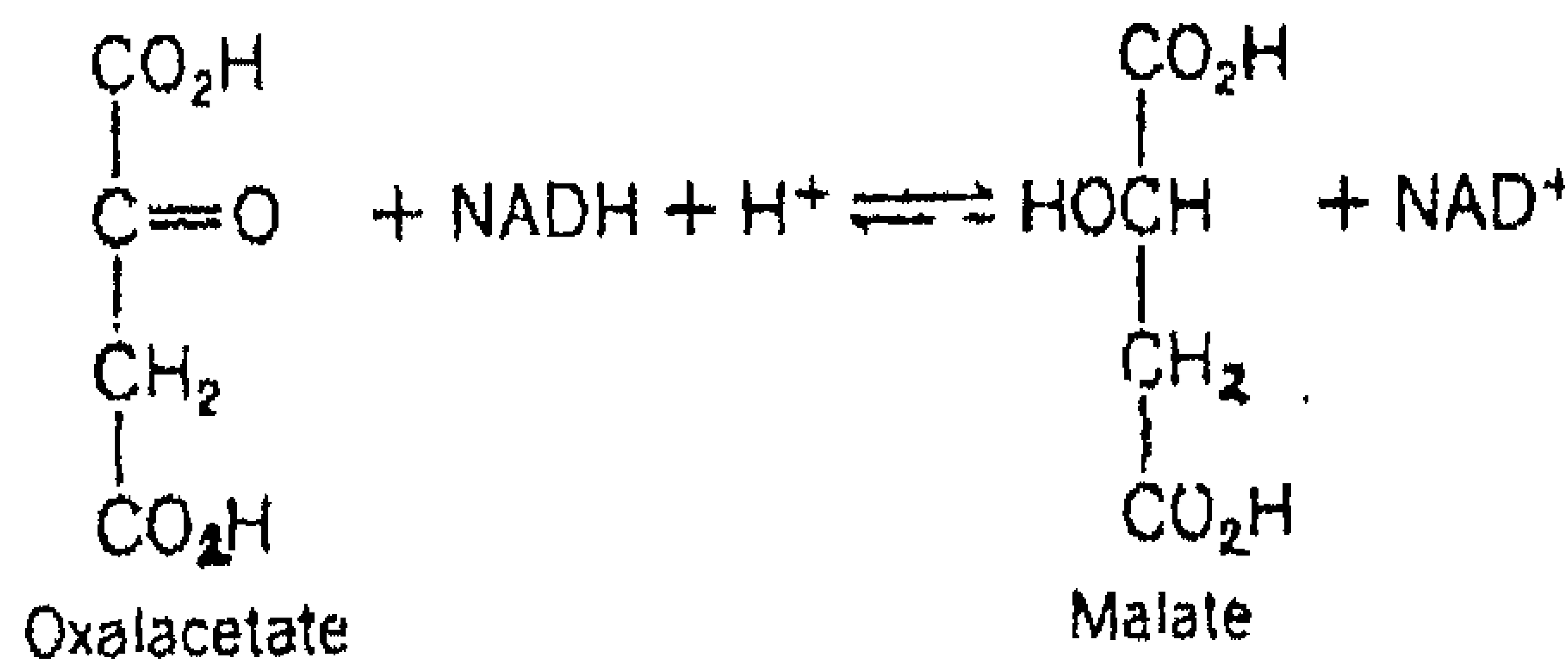
نظام البوابات لإدخال مكافئات الإختزال إلى داخل المايتوكوندريا

تجدرالإشارة إلى أن غشاء المايتوكندريا الداخلي غير نفوذ للمركب NADH ال NAD^+، ولهذا يجب إعادة أكسدة المركب NADH لتستمر عملية تحلل السكر في السايتوبلازم. ويتم ذلك بإنتقال الإلكترونات إلى داخل

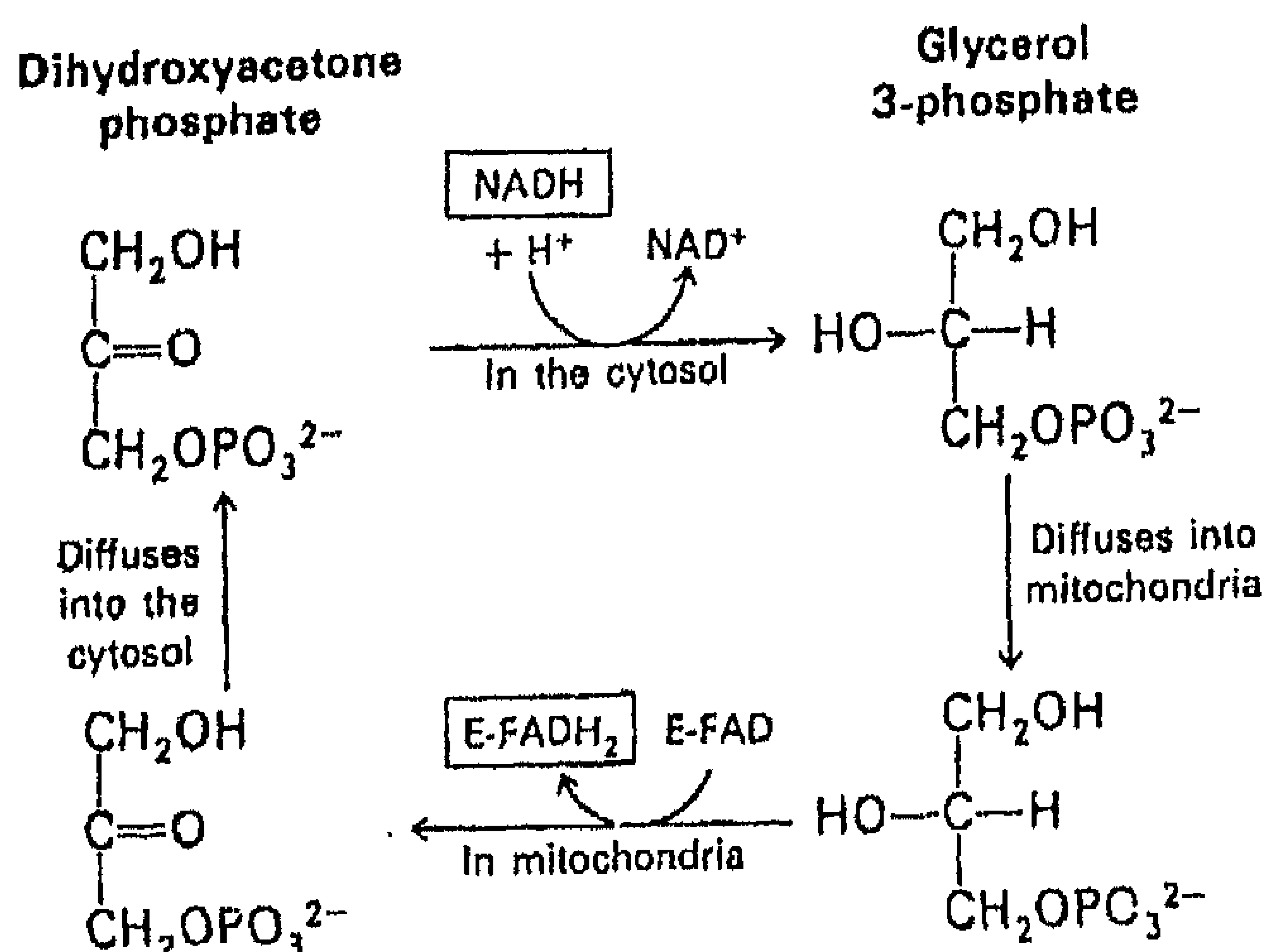
المايتوكوندريا بواسطة جزيئات ناقلة. ومن هذه الجزيئات كلسيرول -3- فسفات التي تدخل المايتوكوندريا بسهولة.

يوضح الشكل (3-31) كيفية تكوين كلسيرول -3- فسفات من فسفات ثنائي phate dehydrogenase ثم إعادة أكسدته إلى فسفات ثنائي هدروكسي الأستون في غشاء المايتوكوندريا الداخلي حيث ينساب الزوج الإلكتروني من كليسرول -3- فسفات إلى المجموعة FAD المرتبطة بالأنزيم Glycerol-3- phosphate dehydrogenase. يختلف هذا الأنزيم عن نظيرة الموجود في السايتوسول بإستخدامه FAD عوضاً عن NAD^+ داخل المايتوكوندريا يسلم زوجه الألكتروني إلى اليوبيكوينون (انظر 3-1-2-3) ونتيجة لذلك تتكون جزيئتا ATP عوضاً عن ثلاثة في حالة أكسدة الNADH. إن ما ذكر يشكل ما يسمى (بوابة فسفات الكليسرول) phosphate shuttle Glycerol وتكون هذه البوابة فعالة في عضلة الطيران للحشرة. وفي هذه الحالة ينتج عن تحلل السكر 6 جزيئات ATP عوضاً عن 8 جزيئات.

تدخل الإلكترونات إلى مايتوكوندريا خلال الكبد والقلب بواسطة (بوابة مالات- اسبارتات) Malate-aspartate shuttle إذ تنتقل الإلكترونات من NADH في السايتوبلازم إلى الإوكزالواستات:

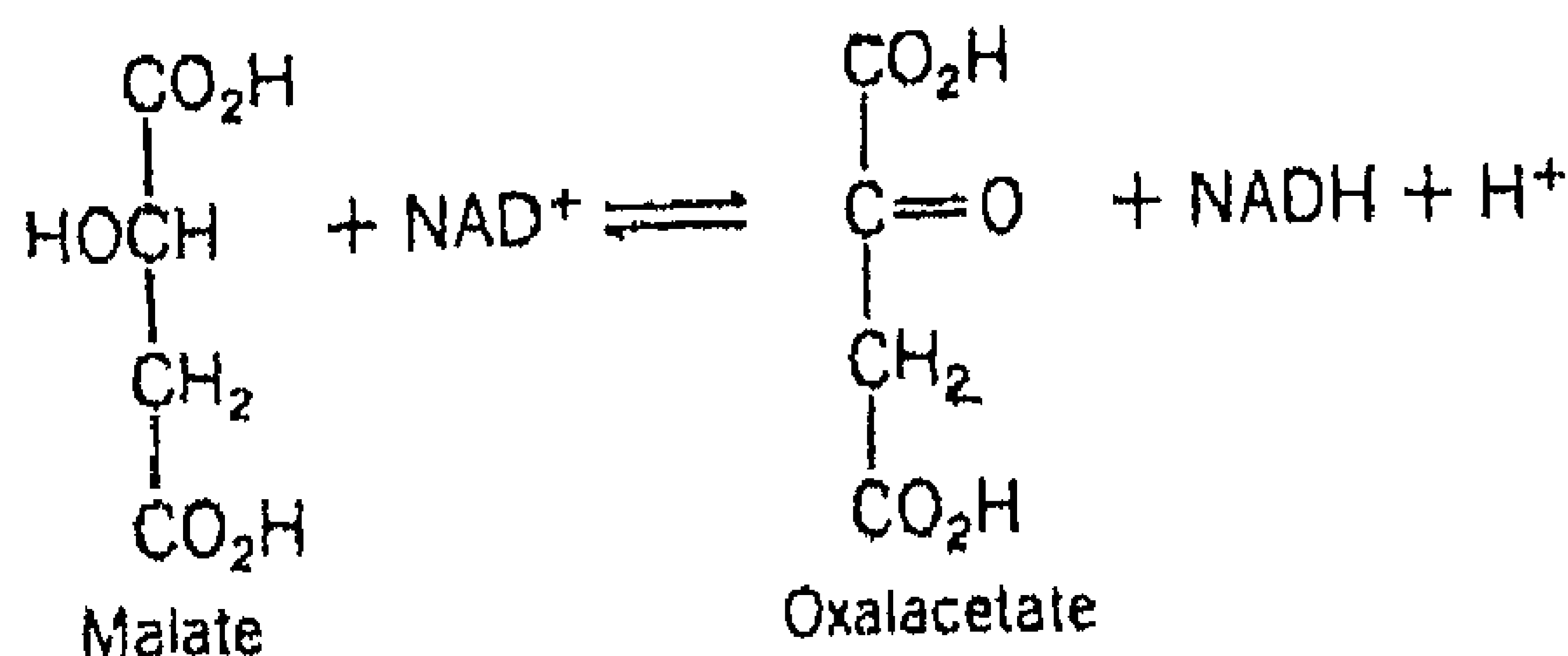


(98-3) ...



شكل (3-31) بوابة فسفات الكلسيرول

ثم تدخل المالات المتكونة في السايتوبلازم إلى المايتوكوندريا وتعاد أكسدتها باستخدام NAD^+ ويحفز كلا العمليتين الأنزيم Malate dehydrogenase :

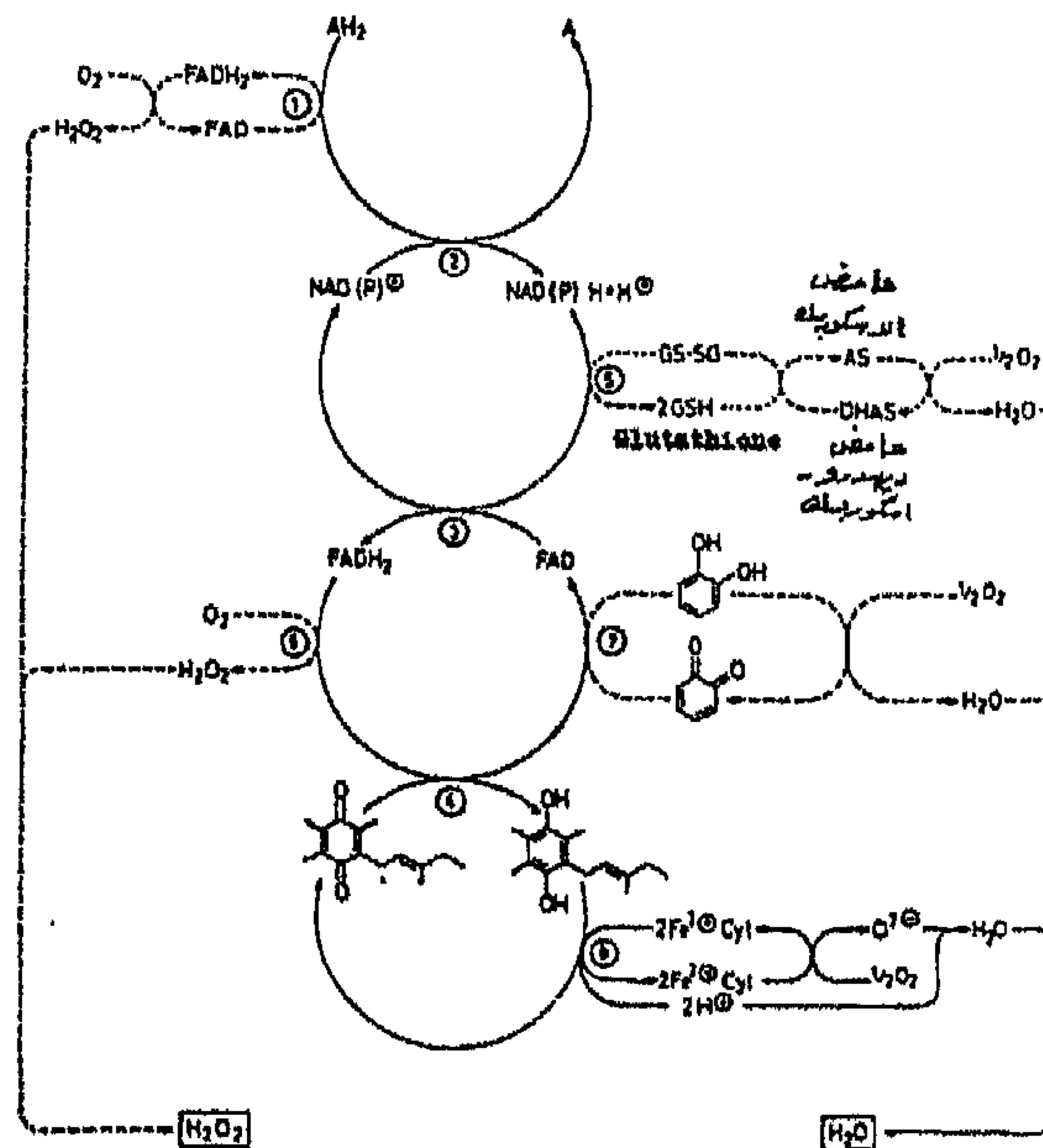


(99-3) ...

تكون المحصلة النهائية لهذه البوابة أكسدة NADH السايتوسولي واختزال NAD^+ في المايتوكوندريا وبذلك تكون حصيلة تحلل السكر في هذه الحالة 8 جزيئات ATP كما في الجدول (3-6).

3-1-1-5 أنظمة الأكسدة النهائية Endoxidation systems:

إضافة إلى انتقال الإلكترونات في السلسلة التنفسية، هناك أنظمة أخرى لجريان الإلكترونات من الركائز إلى الأوكسجين الجزيئي. تلعب هذه الأنظمة دوراً كبيراً في الإختمارات المايكروبية كما تنشأ بواسطتها بعض التغيرات الحيوية على الأغذية ويمكن إختصار هذه الأنظمة بالشكل (3-33) وفيما يأتي بعض تفصيلاتها:



شكل (3-33) أنظمة الأكسدة النهائية Endoxidations. توضح الخطوط المتقطعة هذه الأنظمة أما الخطوط المستمر فتبين كيفية إعادة ذرات الهدروجين للسلسلة التنفسية للحصول على الطاقة.

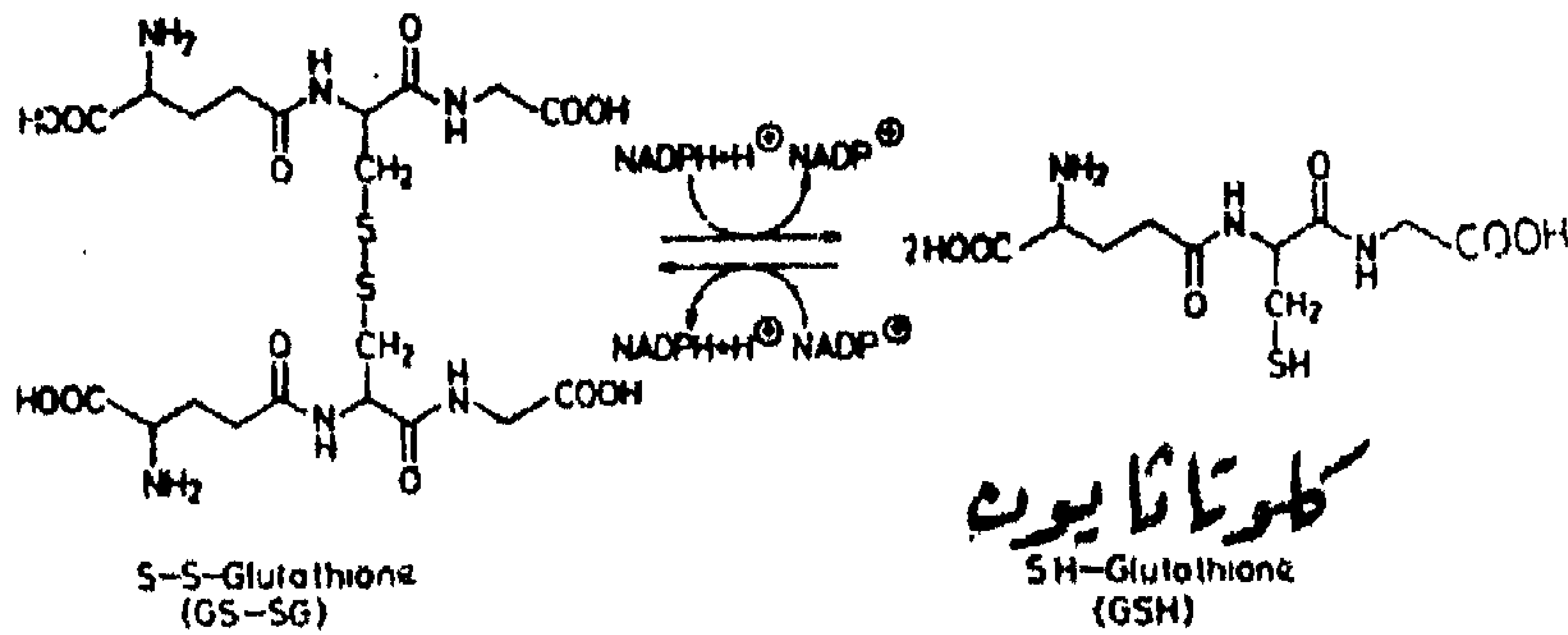
الخطوة الأولى: يمكن نقل ذرات الهدروجين- الناتجة عن أكسدة AH_2- إلى الأوكسجين لتكوين بيروكسيد الهدروجين H_2O_2 وكمثال بواسطة الأنزيم Glucose oxidase والأنزيم Xanthine oxidase حيث يكون FAD تميماً لكليهما.

الخطوة الثانية: وتمثل المسلك الرئيس لإنتقال ذرات الهدروجين من الركائز AH_2 عبر مزيلات الهدروجين المستخدمة NAD^+ أو $NADP^+$.

الخطوة الثالثة: تنتقل ذرات الهدروجين بالمسلك الرئيس من $NAD(P)^+$ إلى FAD بواسطة مزيلات الهدروجين المرتبطة بالفلافينات.

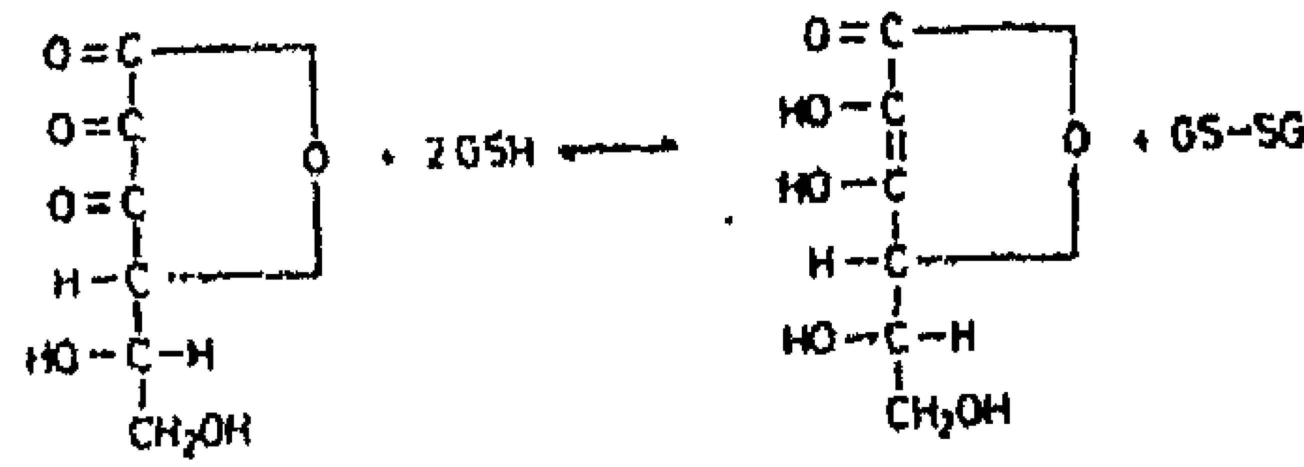
الخطوة الرابعة والثامنة: إنتقال مكافئات الإختزال من $FADH_2$ إلى اليوبكوينون وعبر السايتوكرومات إلى الأوكسجين الجزيئي لتكوين الماء ATP.

الخطوة الخامسة: يتفرع عن المسلك الرئيس مسلك آخر يحصل فيه إنتقال ذرات الهدروجين من NADPH إلى الكلوتاثايون الذي يتحول من الصيغة المؤكسدة إلى الصيغة المختزلة:



(100-3) ...

يحفز التفاعل الأنزيم Glutathione reductase. وأخيراً تنقل ذرات الهدروجين بواسطة الأنزيم Glutathione dehydrogenase إلى Dehydroascorbic acid وبذلك يختزل الأخير إلى حامض الإسكوربيك Ascrbic acid:





(101-3) ...

وأخيراً يعمل الأنزيم Ascorbate oxidase بمثابة أوكسداز نهائي في تحفيز التفاعل الآتي:-

$$2L\text{- Ascorbat} + O^2 \rightarrow 2\text{ Dehydroascorbate} + 2H_2O$$

(102-3)...

الخطوة السادسة: وتمثل تفاعل أكسدة نهائية آخر ويحصل بواسطة بعض الأنزيمات الفلافينية Flavoenzymes حيث تنقل ذرات الهدروجين إلى O_2 ويتكون بذلك H_2O_2.

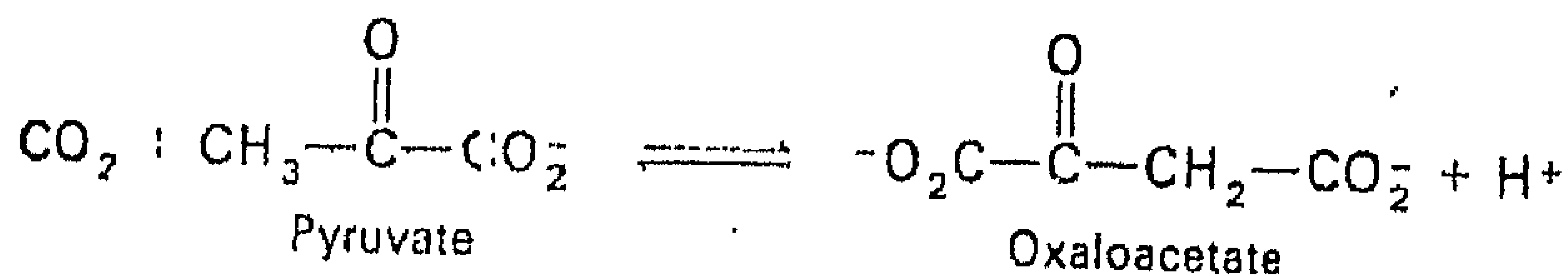
الخطوة السابعة: وهي نظام أكسدة نهائي آخر يحصل في النباتات تنتقل ذرات الهدروجين إلى الكوينون لتكوين Catechol ثم يؤكسد الأخير بالأنزيم phenol oxidase إلى الكوينون مع تكوين الماء.

3-1-2-6 الإختمارات الهوائية المتخصصة والتخليق الحيوي:

تقوم بعض الأحياء المجهرية بإستخدام الأحماض ثنائية وثلاثية الكربوكسيل لتنفسها وينتج عن العملية ماء وثاني أوكسيد الكربون. كما تعيد تكوين حامض الاوكزالواستك وهو المركب المستقبل لاستيل تميم الأنزيم Acetyl CoA)A) إن هذه الأحماض لا تنتج بكميات كبيرة وإنما فقط لسد حاجاتها الأيضية. إلا أن هناك أنواعاً من الفطر لها القابلية على الإكثار من إنتاج الأحماض ثنائية وثلاثية الكربوكسيل الموجودة في

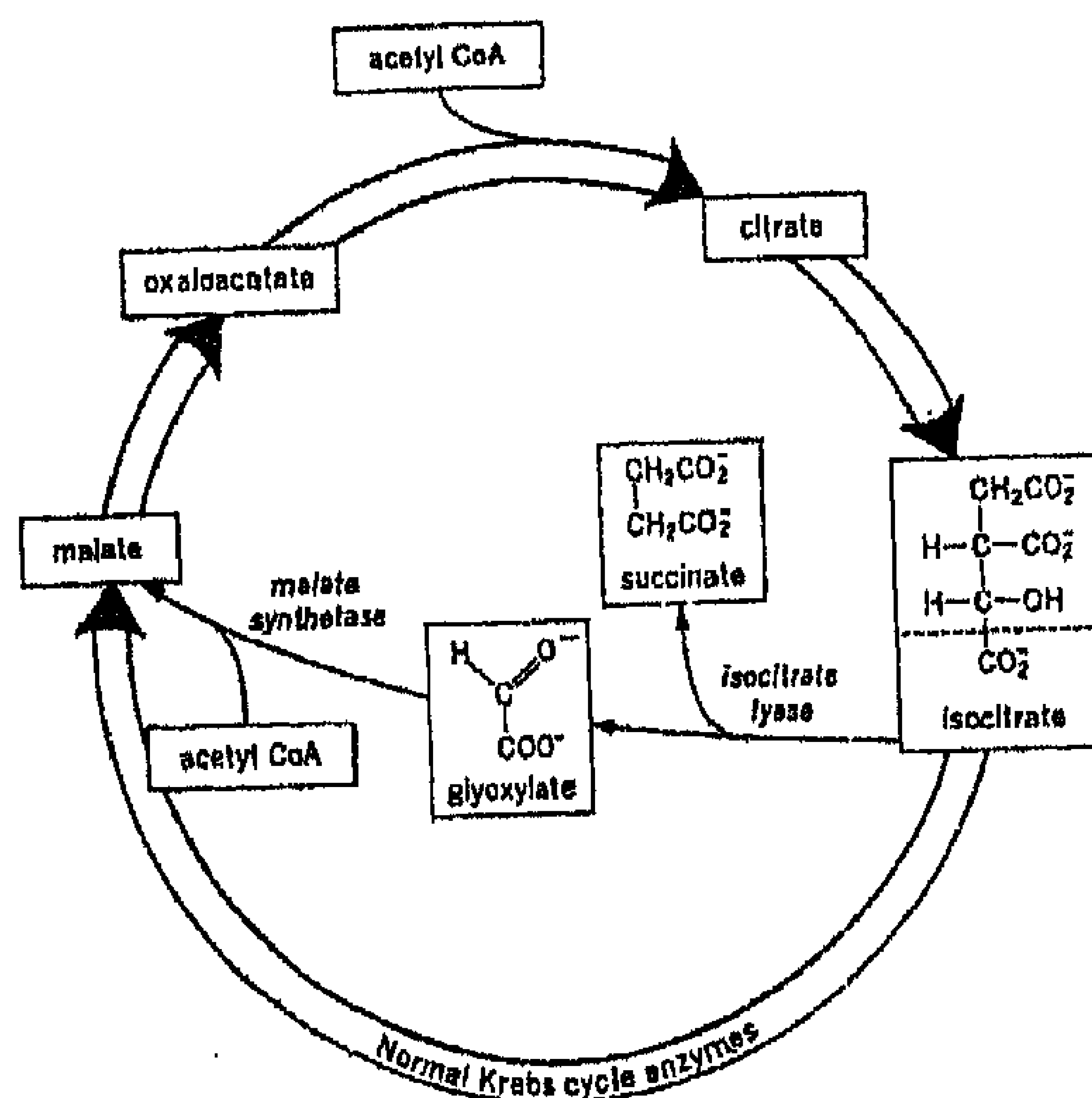
المراحل الوسطية لدورة حامض الستريك شكل (3-24) ولقد فسر ذلك بالفرضيات الآتية:

أ. يمكن إدخال ذرة كاربون إضافية في دورة حامض الستريك بعملية تثبيت ثاني أوكسيد الكربون في حامض البيروفك وتكون حامض الإوكزالواستيك ويسمى هذا التفاعل بـWood-werkman reaction:



(103-3) ...

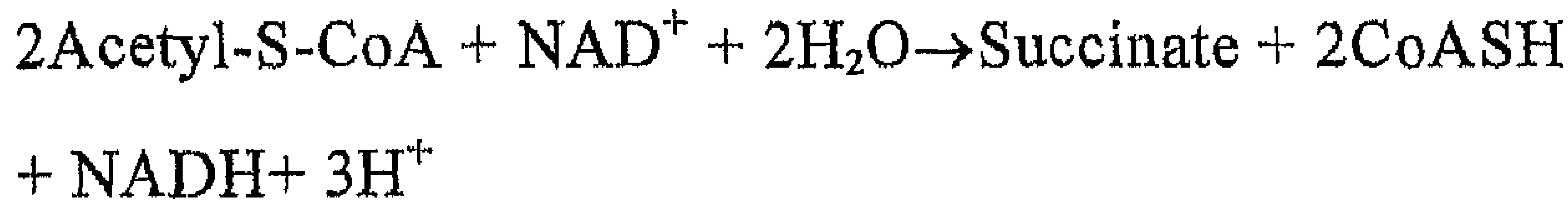
كما يمكن أيضاً تكوين حامض المالك بتفاعل تكثيف بين Acetyl CoA وحامض الكلايكوكسل الذي يتكون في دورة الكلايكوكسلات (شكل 3-33).



شكل (3-33) دورة الكلايوكسلات. إن السكسنات المتكونة زائدة عن حاجة دورة حامض الستريك وتستخدم في التخليق الحيوي.

تحصل دورة الكلايوكسلات بصورة خاصة عند إنبات بذور النباتات الغنية بالدهون، وتوجد في بعض الأحياء المجهرية وتختلف عن دورة حامض الستريك بوجود انزيمين: الأول [Isocitrate-Glyoxylate-Lyase Threo-DS Isocitrrate lyase]

ويقوم بتحويل السترات إلى السكنسات والكلايوكسلات. تعد السكسنات ناتجاً نهائياً في الدورة ويمكن إستخدامها في تخليق مركبات أخرى أكثر تعقيدا. أما الكلايكوكسلات فتتكاثف مع Acetyl CoA بوجود الأنزيم الثاني الخاص بهذه الدورة وهو الأنزيم Malate Synthetase ويتكون نتيجة لذلك حامض المالك. يتضح مما ذكر تثبيت وحدتي إستيل (الأولى عند تكوين السترات والثانية عند تكوين المالات) وإنتاج السكنسات في دورة تامة للكلايوكسلات ويمكن كتابة المعادلة الإجمالية لها كالآتي:



$$2\text{Acetyl-S-CoA} + NAD^{+} + 2H_2O \rightarrow \text{Succinate} + 2\text{CoASH} + \text{NADH} + 3H^{+}$$

(104-3)....

ب. يؤدي تنشيط الأنزيم Citrate synthase إلى إنتاج المزيد من الأحماض ثنائية وثلاثية الكربوكسيل.

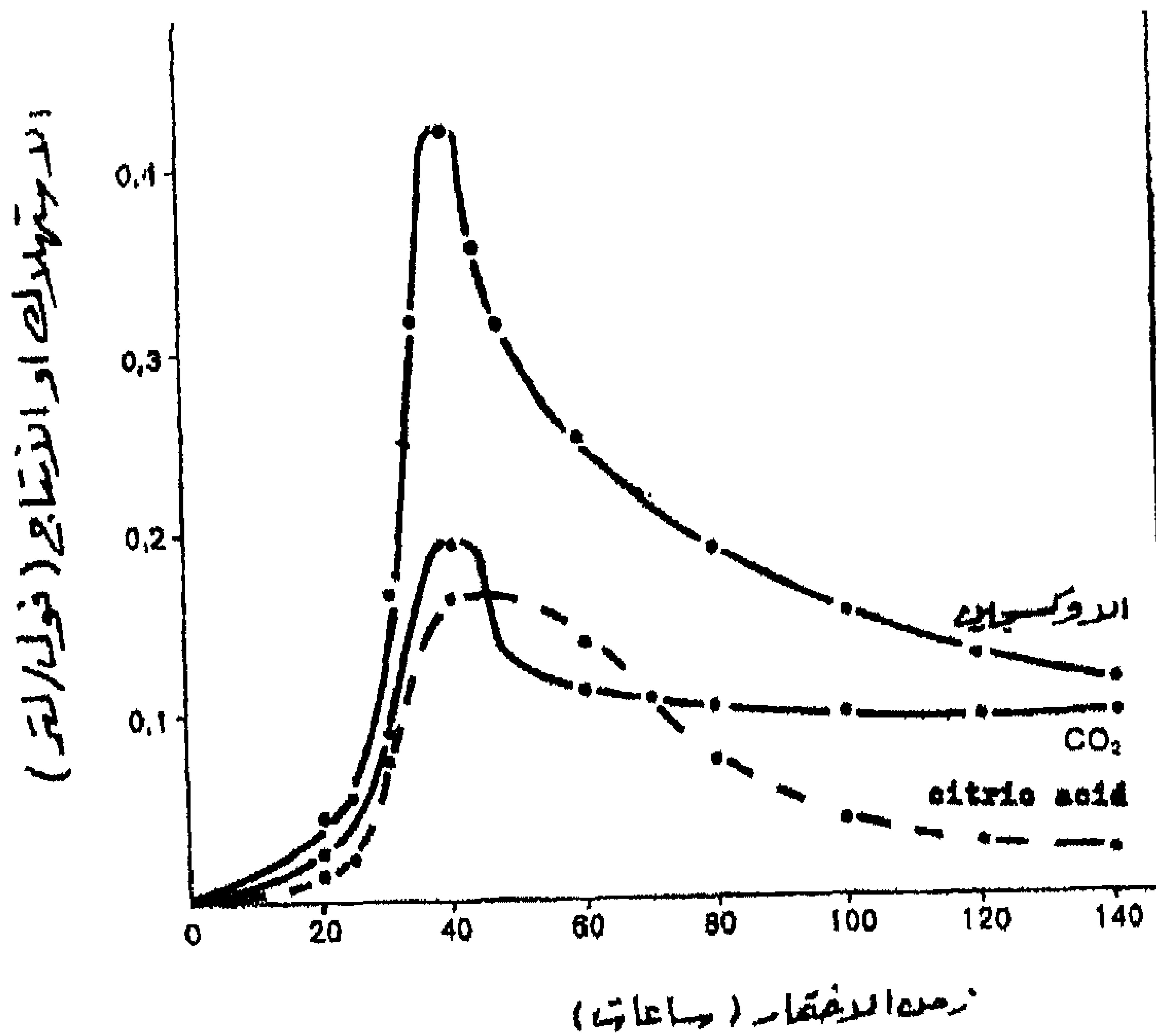
الإختمار المنتج لحامض الستريك:

تزداد كمية حامض الستريك الناتج عن الإختمار وقد تصل إلى 70٪ من السكر المختمر وذلك عند تثبيط كل من الأنزيمات: Aconitase و Isocitratc dehydrogenase و Succinate dehydrogenase و Fumarate dehydrogenase و Malate dehydrogenase. أي عند تثبيط نكوص حامض الستريك. يتم الإختمار المنتج لحامض الستريك بواسطة سلاسلات مختارة من الفطر Aspergillus niger ويعد مهماً في تكنولوجيا الغذاء حيث أن حامض الستريك

يكسب المادة الغذائية نكهة خاصة ويستعمل لذلك بكميات كبيرة في صناعة المشروبات ويبلغ الإنتاج السنوي لهذ الحامض 200000 طن وتتزايد هذه الكمية سنوياً.

يتم الإختمار المنتج لحامض الستريك على الأغلب بطريقة المزارع السطحية وبإستعمال المولاس بمثابة ركيزة في الإختمار. ولقد طورت مؤخراً المزارع الغاطسة أيضاً لإنتاج حامض الستريك وفي كلتا الحالتين يجب توفير تهوية جيدة للإختمار.

وضح الشكل (3-34) العلاقة بين إستهلاك الأوكسجين وتكوين حامض الستريك CO_2.



شكل (3-34) العلاقة بين استهلاك الأوكسجين وتكوين حامض الستريك وثاني أوكسيد الكربون.

ولإنتاج حامض السترك من قبل الفطر المذكور، يجب أن يكون الرقم الهدروجيني للمحيط حامضياً جداً (2-2.2) وإلا تحول الإختمار إلى إنتاج كميات كبيرة من حامض الأوكزالك والكلوكونك وهذا ما يحصل في المحيط الحامضي الضعيف.

وللإنتاج الأوفر لحامض السترك، يجب توفر السكر بتركيز 10-20٪ في الركيزة المستعملة للإختمار. كما إن إضافة Hexacyanoferrate للركيزة يقلل من تأثير أيونات المعادن الثقيلة وذلك بتكوين معقد معها كما يحصل مع الحديد والمنغنيز. كما إن إضافة الميثانول في بعض الحالات يزيد من تكوين حامض السترك.

يمكن ترسيب حامض السترك المتكون بعد 3-4 أيام في المزارع الغاطسة و 5-10 أيام للمزارع السطحية ويستخدم الكالسيوم لهذا الغرض. ويتم الحصول على حامض السترك الحر بمعاملة أملاح السترات بحامض الكبريتيك المخفف:



$$2C_6H_8O_7 + 3Ca(O)_2 \rightarrow Ca(C_6H_5O_7)2 + 3H_2O \qquad (105-3)...$$

Citric acid



$$Ca_3(C_6H_5O_7)_2 + 3H_2SO_4 \rightarrow 2C_6H_8O_7 + 3CaSO_4 \qquad (106-3)...$$

تجدر الإشارة إلى أن الإنتاج الأوفر لحاض السترك يتم عند زيادة سرعة التفاعلات المؤدية إلى إنتاجه وتثبيط التفاعلات المؤدية إلى نكوصه وكمثال يؤدي تثبيت CO_2 لإنتاج الاوكزالواستات من البيروفات إلى زيادة تكوين حامض السترك وهكذا نلاحظ عدم فقدان CO_2 عملياً في الفترة النشطة للإختمار المنتج لحامض السترك ويمكن توضيح مجمل تفاعلات هذا الإختمار كالآتي:

(107-3) ... Glucose → 2pyruvic aicd

(108-3)... Pyruvic acid → Acetyl CoA + CO_2

(109-3)... Pyruvic acid + CO_2 → Oxaloacetic acid

(110-3)... Oxaloacetic acid + Acetyl CoA → Citric acid

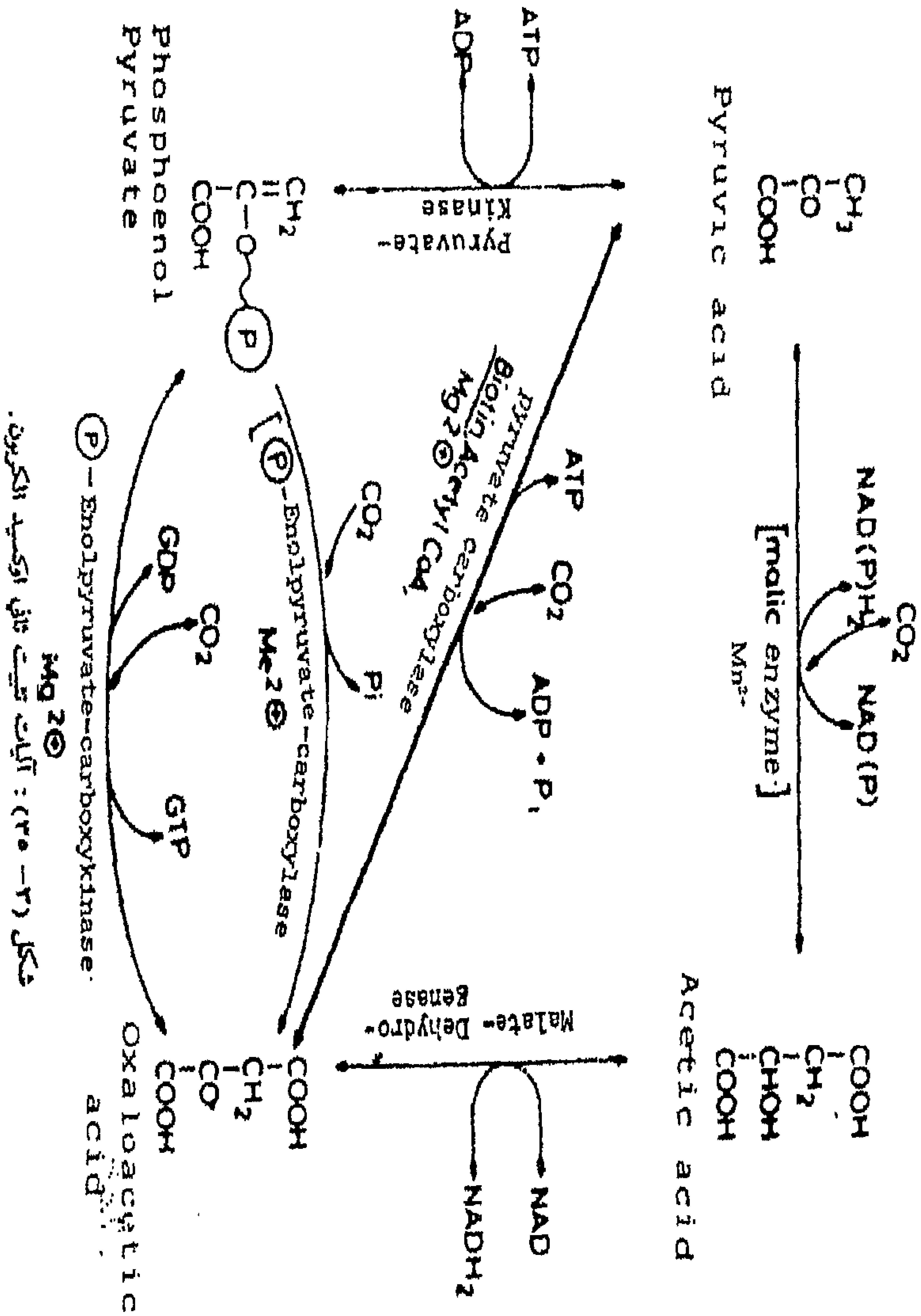
(111-3).... Glucose Citric acid :المحصلة

ولتثبيت CO_2 أو HCO_3^- هناك آليات مختلفة غير ما ذكر في أعلاه وكما موضح في الشكل (3-35) وهي:

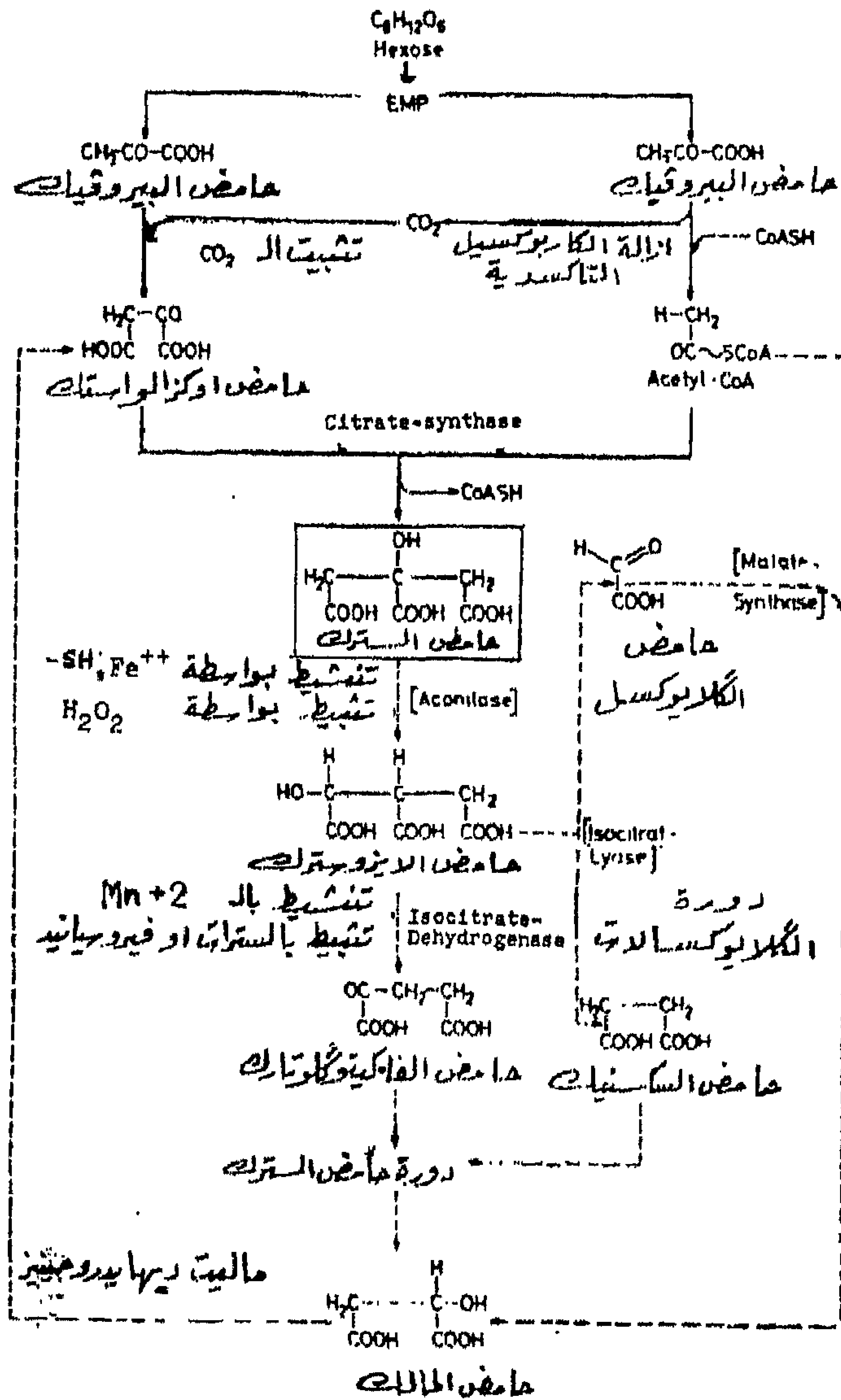
أ. تكوين حامض المالك بوجود أنزيم المالك

ب. تكوين حامض الاوكزالواستك بوجود الأنزيم Phosphoenolpyruvate carboxykinase

يوضح الشكل (3-36) التفاعلات المؤدية إلى تكوين حامض الستريك في الفطر Aspergillus niger. يوضح الشكل وجود دورة الكلايوكسلات إضافة إلى دورة حامض الستريك وتفاعل تثبيت ثاني أوكسيد الكربون لإنتاج الاوكزالواستات.


Pyruvic acid
Acetic acid
Phosphoenol Pyruvate
Oxaloacetic acid
malic enzyme
NAD(P)H
NAD(P)
CO_2
Pyruvate-Kinase
ATP
ADP
Malate-Dehydrogenase
NAD
$NADH_2$
Pyruvate carboxylase
Biotin, Acetyl CoA, Mg^{2+}
ADP + Pi
P-Enolpyruvate-carboxylase
Pi
P-Enolpyruvate-carboxykinase
GDP
GTP

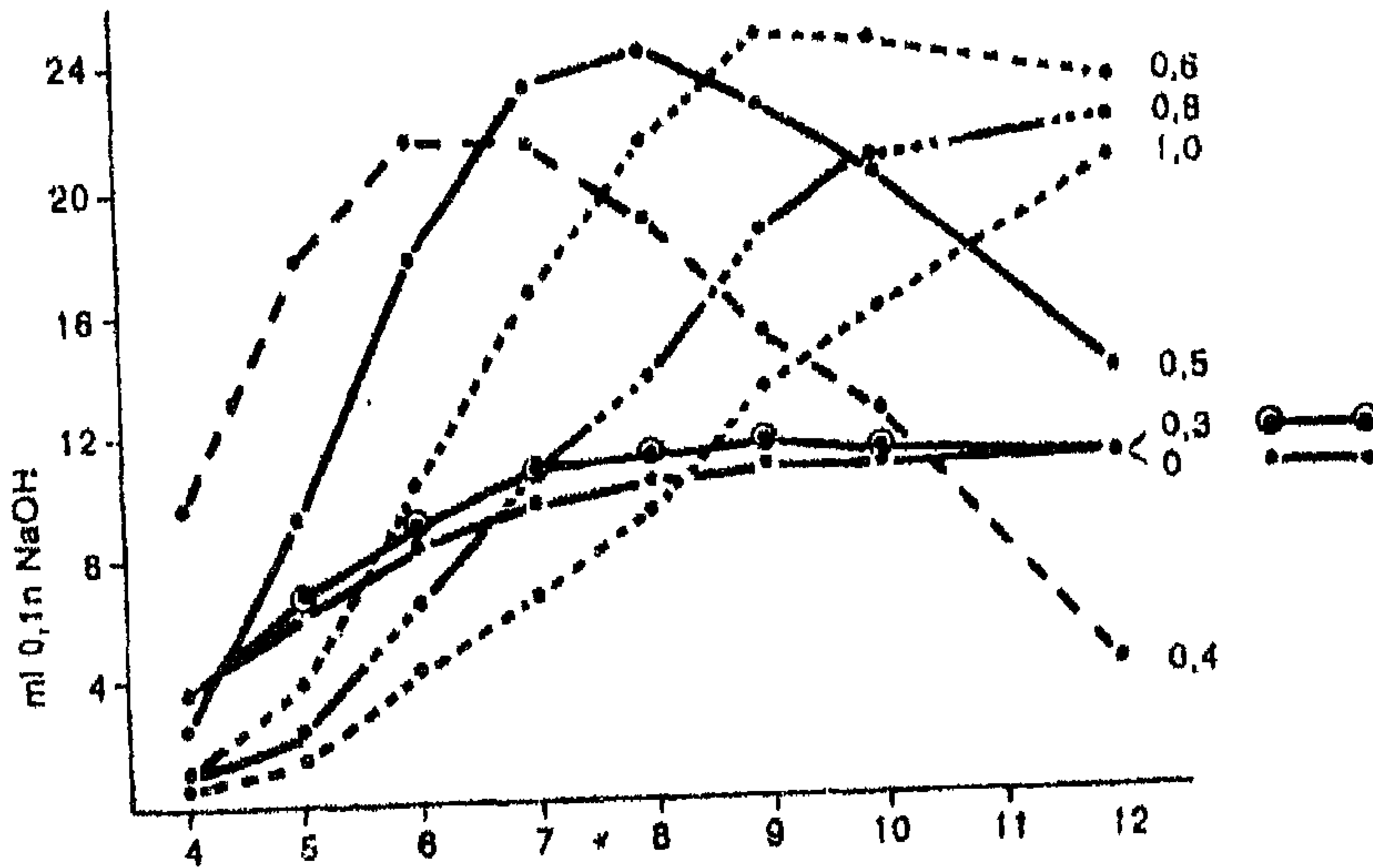
شكل (3–35)



شكل (3-36) الاختمار المنتج لحامض الستريك في الفطر **Aspergillus niger**.

لا يزال هناك بعض الغموض حول آلية إنتاج حامض الستريك بكميات كبيرة. وتلعب عملية تثبيط أنزيمات دورة حامض الستريك دورا حاسماً في هذا المجال وكمثال تثبيط الأنزيم Isocitrate dehydrogenase تنافسيا بواسطة حامض الستريك. إن تراكم حامض الستريك يؤدي إلى انخفاض الرقم الهيدروجيني إلى أقل من 2.

يمكن زيادة إنتاج حامض الستريك بإضافة (II) Hexacya no Ferrate كما ذكر سابقا لتكونيها معقدا مع الحديد الموجود في الأنزيم Aconitase والمنغنيز الموجود في الأنزيم Isocitrate dehydrogenanse وبذلك يثبط هذان الإنزيمان. يوضح الشكل (3-37) تأثير التركيزات المختلفة من هذا المركب في إنتاج حامض الستريك. يتضح من الشكل بأن التركيز المثالي هو 0.6 غم/لتر.



شكل (3-37) تأثير التركيزات المختلفة من $K_4Fe(CN)_6$ (HexacyanaferrateI) - مقدرة بالغرامات / لتر - في سير الاختمار في المولاس.

لحامض الستريك استخدامات أخرى إضافة إلى ما ذكر عن استعمالاته في تكنولوجيا الأغذية وفي المشروبات. يكون حامض الستريك ثلاثة أنواع من الأملاح

والاسترات وهي Mono-,Di- and Tri- Citrate. تكون الأملاح القاعدية عادة سهلة الذوبان وتتبلور بصورة جيدة، ولقد عرف تأثير الأملاح القاعدية للسترات لمنع تخثر الدم منذ 1890. ولمنع التخثر يضاف 0.4-1٪ Trisodium citrate. يكون هذا الملح اواصر مخلبية مع أيونات الكالسيوم لمنع التخثر. تكون أملاح حامض السترك ذات التكافؤ المتعدد، من الأيونات الموجبة صعبة الذوبان مثل Tricalcium citrate ولكن إضافة كميات فائضة من حامض السترك إلى محاليل هذه الأملاح تؤدي إلى تكوين أملاح معقدة ذائبة في الماء. يوضح الجدول 3-7 صفات بعض أملاح السترات.

جدول 3-7: صفات بعض أملاح السترات

	التركيب	PH محلول 1٪	الوزن الجزيئي	الذوبانية g/100g H_2O
Monosodium citrate	$NaC_8H_7O_7H_2O$	3.75	232.13	20°C 16.8
				50°C 37.4
				80° C 64.7
Trisodium citrate	$Na_3C_6H_5O_2H_2O$	8.55	294.11	20°C 75.0
				50° C 87.2
				80°C 99.8
	$Na_3C_6H_5O_75_{1/2}H_2O$	7.95	348.16	20°C 79.4
				50°C 121.8
				80°C 199.5
Tripotassium citrate	$K_3C_6H_5O_7H_2O$	7.25	324.42	20° C 5.1
				50°C 186.4
				80°C 199.5

الذوبانية g/100g H_2O	الوزن الجزيئي	PH محلول 1٪	التركيب	
20° C 5.1	422.32	3.2	$CaH_4(C_6H_5O_7)_2$	Monccalcium citrate
50°C 4.5				
80°C 2.1				
20°C 0.82	284.24	5.6	$CaH(C_6H_5O_7)\ 3H_2O$	Dicalciun citrate
50°C 0.51				
80°C 0.49				
20°C 0.09	570.52	7.8	$Ca_3(C_6H_5O_7)_2\ 4H_2O$	Tricalcium citrate
50°C 0.07				
80°C 0.06				

الإختمار المنتج لحامض المالك:

يعد هذا النوع من الإختمار موغوبا في تكنولوجيا الأغذية ولاسيما في صناعة المشروبات ويحصل في سلاسلات مختارة من Aspergillus oryza.لتخليق حامض المالك علاقة وثيقة بحامض الفيورماك لأن الأخير يمثل السلف له.

الإختمار المنتج لحامض الفيومارك:

يتم هذا الإختمار في بعض السلالات مثل Rhizopus nigricans و R.arrhizus ولكنه لا يلعب دوراً في التصنيع الغذائي لأن الطرق الكيميائية لإنتاج حامض الفيومارك انفع من الإختمار.

ويستخدم حامض الفيومارك لإعطاء نكهة خاصة في صناعة المشروبات.

يتم إنتاج هذا الحامض بكميات كبيرة في الإختمار نتيجة لإدخال Acetyl CoA دورة الكلايوكسلات كما يتكون أيضا نتيجة تثبيت ثاني أوكسيد

الكربون في حامض البيروفك وتكوين الاوكزالواستك الذي يرتبط بالاستيل تميم الأنزيم Acetyl CoA)A) لإعطاء حامض السترك. ومن خلال دورة حامض السترك يتم تكوين الفيومارك. يمكن توضيح ما تقدم بالمعادلات الآتية:


Isocitric acid→ Tartaric acid + Glyoxlic aicd .....(112-3)


Acetyl CoA + Glyoxylic aicd → Malic acid + CoASH-2H .....(113-3)


Malic acid → Oxaloacetic acid .....(114-3)


Acetyl CoA + Glyoxlic aicd → Citric acid + CoASH .....(115-3)


Citric acid→Isocitric acid .....(116-3)


Succinic acid →Fumaric acid .....(117-3)

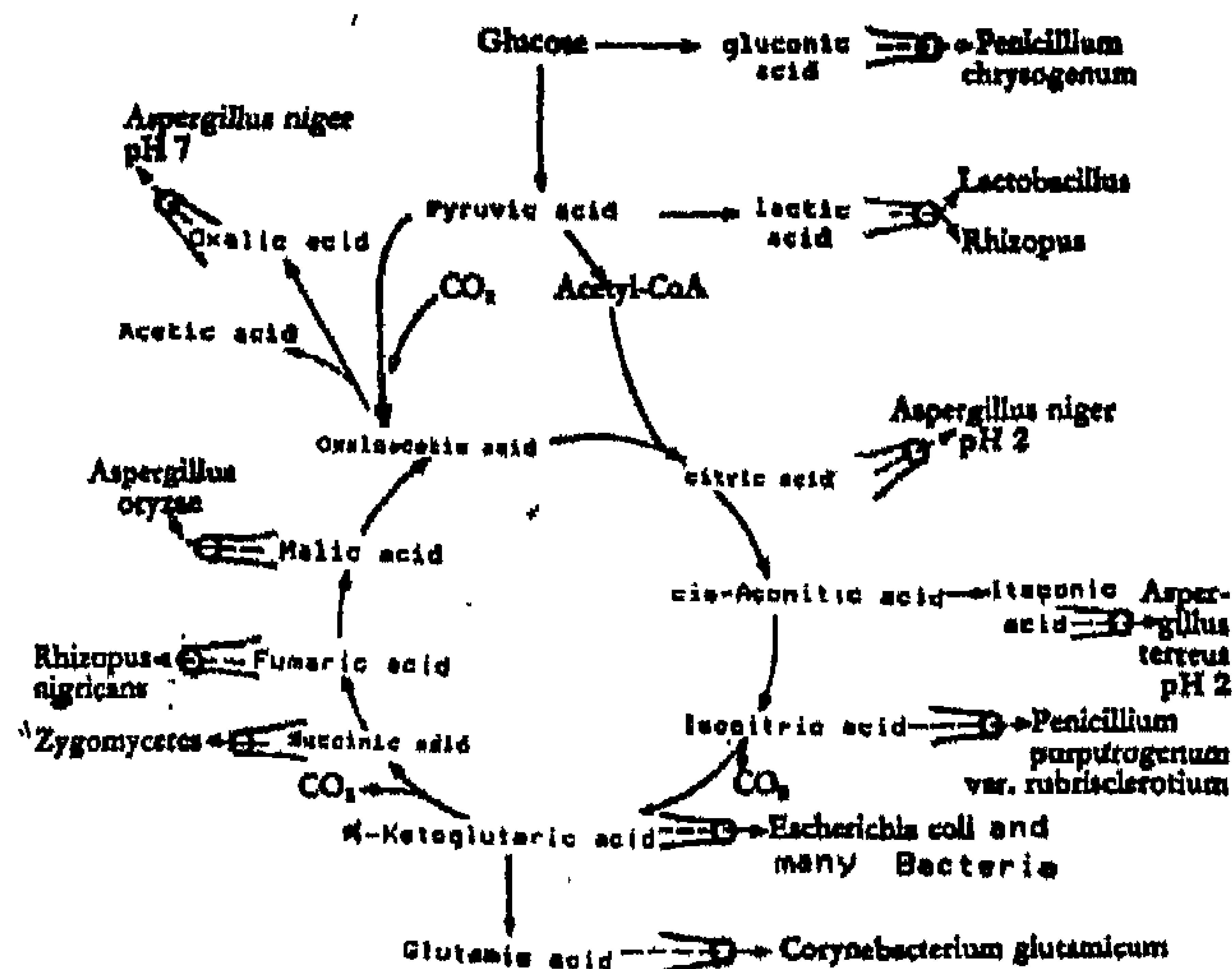

المحصلة (118-3)......2Acetyl CoA→Fumaric acid + 2 CoASH

وأخيرا يوضح الجدول 3-8 أهم الأحياء المجهرية المتميزة بقدرتها على إنتاج الأحماض العضوية من دورة حامض السترك.

كما يوضح الشكل 3-38 أنواع الفطريات الطحلبية التي تتمكن في ظروف خاصة إنتاج المركبات الوسطية في دورة حامض السترك.

جدول (3-8): الأحماض العضوية التي تنتجها الأحياء المجهرية في الإختمار الهوائي.

الأحماض العضوية	الكائنات المجهرية
Cis-Aconitic acid	Aspergillus niger A. itaconicus
Isocitric acid	Penicillium purpurogenum v.rubrisclerotium
Itaconic acid	Aspergillus terreus. A. itaconicus
α-Ketoglutaric acid	Acbromobacter orientalis Pseudomonas fluorescens. P. ovalis. Aerobacter aerogenes
Succinic acid	Ribizopus -Arten
Fumaric acid	Rbizopus nigricans, R. delemar. R. arrbizus Aspergillus fumaricus
Malic acid	Rbizopus nigricans. Aspergillus oryzae. A. flaws. A.parasiticus. penicillium corylopbilum. Pseudomonas trifolii. Lactobacillus brevis
Oxalic acid	Aspergillus niger (PH 7.0(
Pyruvic acid	Acetobacter suboxydans. Pseudomonas aeruginosa. X anthbomonas- Arten



شكل (3-38) تكوين الأحماض العضوية المختلفة بواسطة بعض أنواع الفطريات الطحلبية..

الاختمار المنتج لحامض الخليك ونواتج الأكسدة المشابهة له :

تعتمد جميع الإختمارات التي مر ذكرها على تقويض السكريات سداسية الكربون Hexoses بمسلك تحلل السكر EMP حيث يؤدي المسلك إلى تكوين حامض البيروفك الذي يتحول بدروه إلى Acetyl CoA يدخل دورة حامض السترك. ولعدم استمرار تفاعلات دورة مستمرة لأسباب ذكرت سابقا، تتكون نتائج الإختمار المختلفة مثل حامض السترك والفيومارك والمالك.

هناك نوع آخر من الإختمارات الهوائية لا يتغير فيها عدد ذرات كربون الركيزة المستخدمة وإنما تتغير فقط المجموعة الفعالة ويعد هذا النوع من الإختمار مهما تكنولوجيا ومن أنواعه:

أ- تحول الايثانول إلى حامض الخليك

ب- تحول الكلسيرول إلى ثنائي هدروكسيل الاستون

جـ- تحول المركب Sorbit إلى Sorbose

د- تحول الكلوكوز إلى حامض الكلوكونك

هـ- تحول الكلوكوز إلى حامض Ketogluconic acid-2

و- تحول الكلوكوز إلى حامض Iso-ascorbic

ز- تحول الكلوكوز إلى حامض L-ascorbic

ويحصل التأكسد في هذه التخمرات نتيجة لسحب ذرات الهدروجين ونقلها عبر السلسلة التنفسية لتكوين الماء وإنتاج الطاقة بشكل ATP(شكل 3-38).

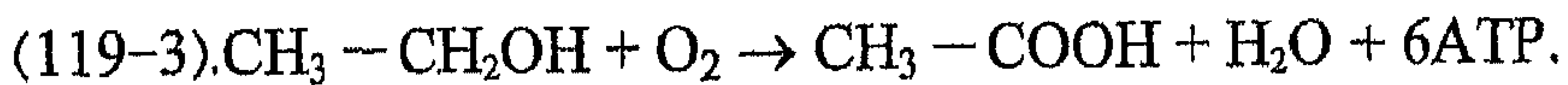
الاختمار المنتج لحامض الخليك من الايثانول:

الاختمار المنتج لحامض الخليك (الخل) عرف منذ مئات السنين. ويستخدم في صناعة الخل بكتريا من جنس Acetobacter قادرة على تحويل الإيثانول إلى حامض الخليك. وتتصف بعض أنواع هذه البكتريا مثل Acetobacter xylinum بتكوين طبقة غشائية على سطح السائل المختمر.

تستخدم حاليا أجهزة لتصنيع الخل تستعمل فيها أجهزة دوران Recirculating generators تمرر السائل الكحولي بانتظام على نشارة الخشب ويزود الحيز السفلي من الجهاز بثقوب للتهوية أو بمروحة لدفع الهواء. كما أن هناك أجهزة أخرى مستخدمة في الصناعة على نطاق ضيق لإنتاج الخل بطريق التحليل المغمور Submerged

Acetification حيث يستخدم صهريج من الصلب غير القابل للصدأ والممتلىء بالسائل الكحولي ويضاف إليه بكتريا حامض الخليك. يكون الصهريج مزوداً بجهاز تهوية يقوم بدفع الهواء في السائل على هيئة فقاعات منتظمة فيتأكسد الكحول إلى خل. يمكن بهذه الطريقة الحصول على حوالي 99٪ من كمية الخل المحسوبة نظريا. كما تتميز هذه الطريقة بعدم استعمال نشارة الخشب أو الفحم لذلك لا يخشى من تلون الخل بتأثير الحديد الموجود في الفحم.

المعادلة الإجمالية للإختمار المنتج لحامض الخليك كالآتي:-



$$(119-3).CH_3-CH_2OH+O_2\rightarrow CH_3-COOH+H_2O+6ATP.$$

الخطوة الأولى: يمكن توضيح المراحل الوسطية لتحول الايثانول إلى حامض الخليك في الشكل (3-38) حيث تبدأ سلسلة التفاعلات بإزالة ذرات

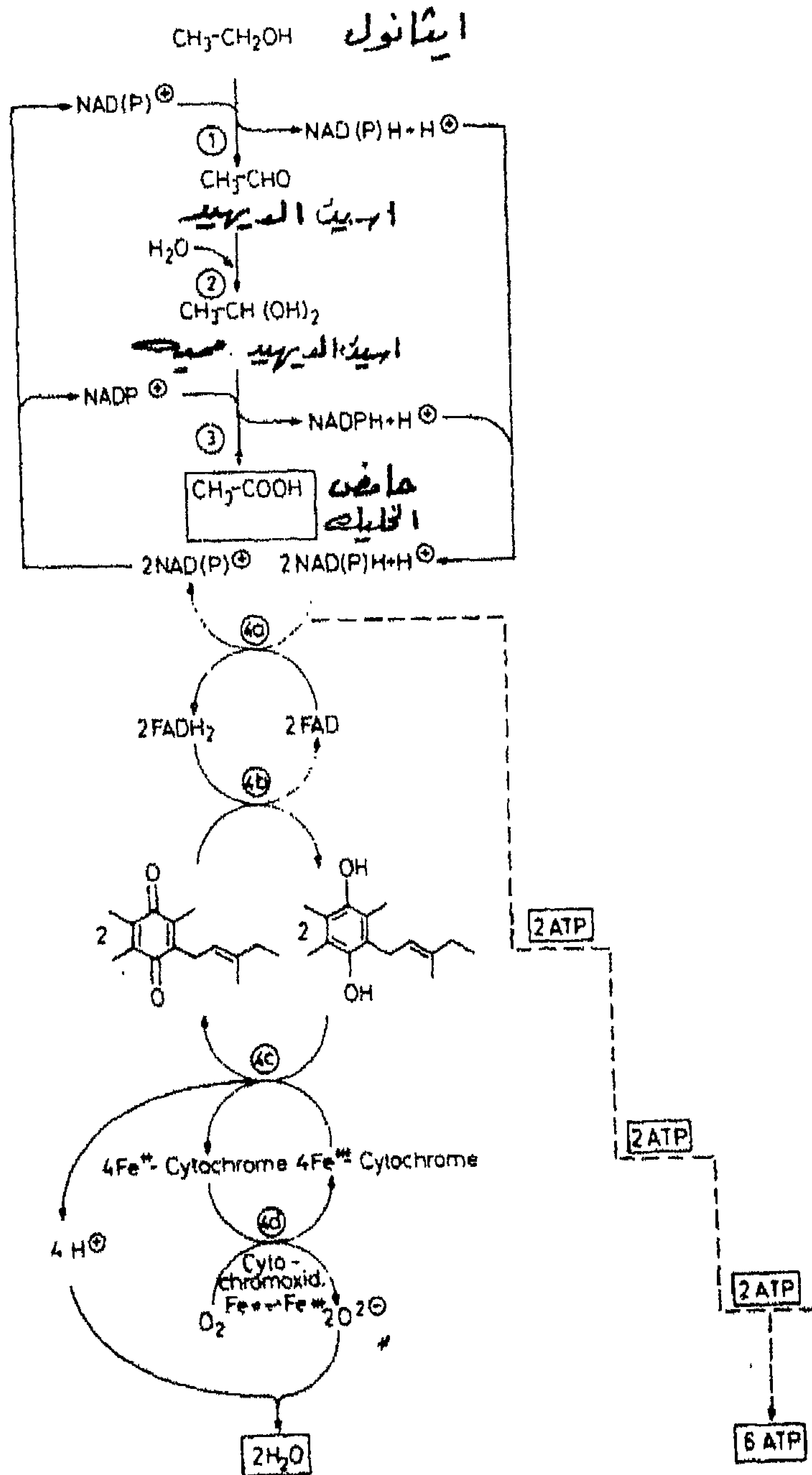
الهيدروجين من الايثانول وتحويله إلى اسيتالدهيد بواسطة الأنزيم Alochol dehydrogenase الذي يستخدم NAD^+ أو $NADP^+$ تبعا لنوع البكتريا Acetobacter فمثلا في البكتريا Acetobacter peroxydans يكون التميم الأنزيمي $NADP^+$.

الخطوة الثانية: وهي تفاعل كيميائي صرف يحصل دون مساعدة أنزيم ويتم فيه تحول الاستيالدهيد إلى Acetaldehyde hydrate بتفاعله مع الماء.

الخطوة الثالثة: تحول Acetaldehyde hydrate إلى حامض الخليك بواسطة الأنزيم المتخصص لـ $NADP^+$ والمسمى NADP-specific aldehyde dehydrogenase.

الخطوات a4 إلى d4 تمثل تفاعلات السلسلة التنفسية وفيها تنقل ذرات الهيدروجين إلى الأوكسجين الجزيئي وتستخدم الطاقة المتحررة نتيجة لذلك في تكوين الATP بالفسفرة التأكسدية.

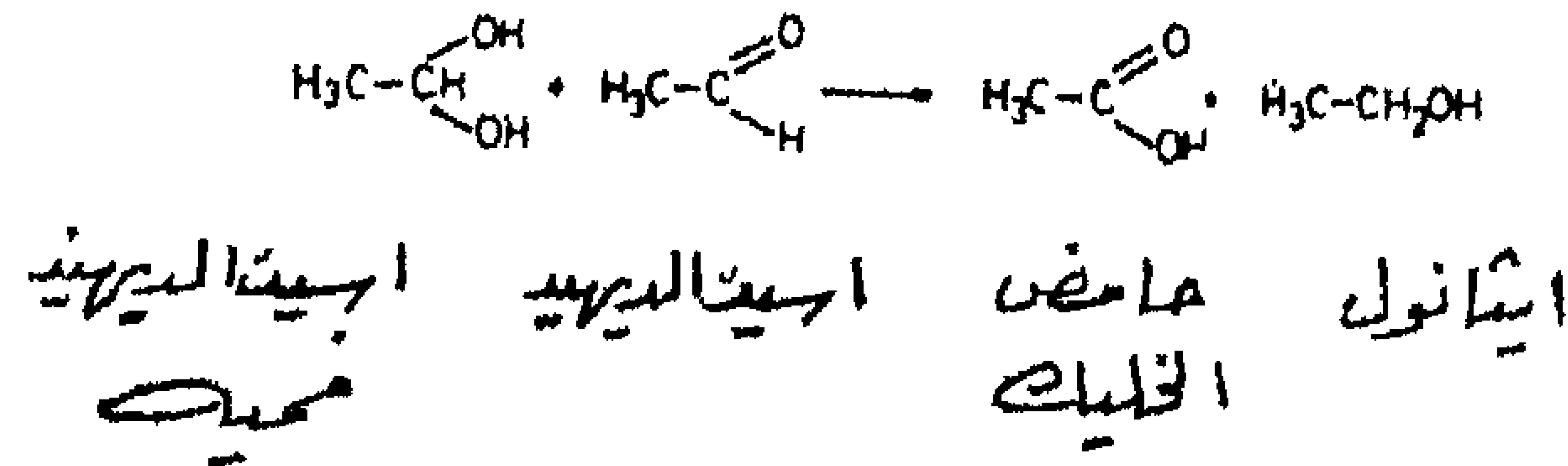
إذا دققنا في عدد جزيئات الماء المتحررة في الشكل 3- 39 وقارناها بعدد جزيئات الماء الناتجة في المعادلة الإجمالية (معادلة 3-119) لوجدنا جزيئتين متحررتين في الشكل المذكور وجزيئة واحدة في المعادلة الإجمالية والسبب يعود لإستهلاك جزيئة ماء لتحول الاستيالدهيد إلى Acetaldehyde hydrate وبذلك تكون المحصلة جزيئة ماء واحدة.



شكل (3-39) الاختمار المنتج لحامض الخليك.

يلاحظ من الشكل 3-39 كذلك تكوين جزيئتي تميم أنزيمي مختزلتين أولاهما في الخطوة الأولى وثانيتهما في الخطوة الثالثة وبذلك ينتج عن أكسدة جزيئة كحول 6 جزيئات ATP نتيجة للفسفرة التأكسدية.

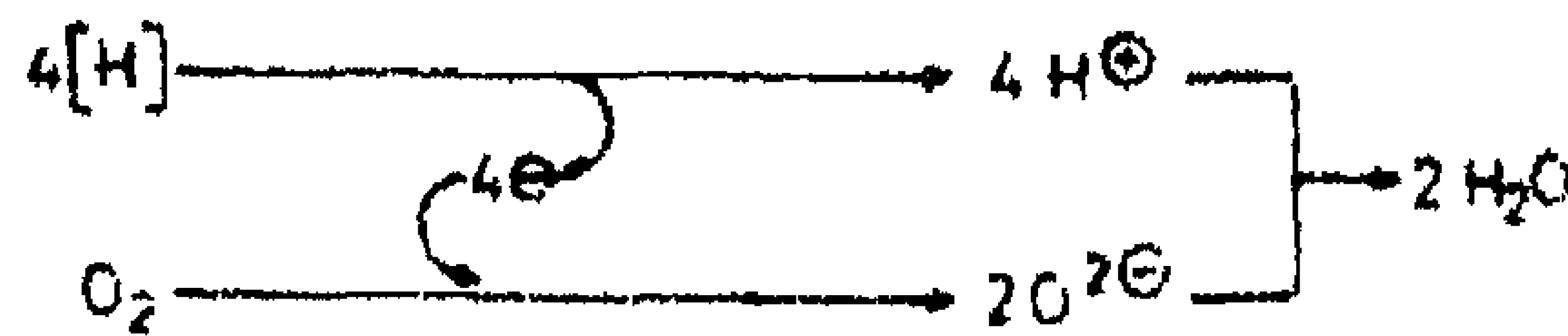
إذا شح الأوكسجين، تستطيع بكتريا حامض الخليك تحفيز التفاعل الآتي والمسمى Dismutation reaction.



(120-3) ...

يمكن تصور هذه المعادلة إزالة الهدروجين من Acetaldehyde hydrate ونقلها إلى الاستيالدهيد الذي يعمل بمثابة متقبل للهدروجين. لاحظ تكوين الإيثانول في هذا الإختمار. إذن في ظروف شحة الأوكسجين يتكون نصف كمية حامض الخليك المنتجة عند توفره.

تستطيع بعض أنواع بكتريا حامض الخليك أن تكون بيروكسيد الهيدروجين كما يأتي:



(121-3) ...

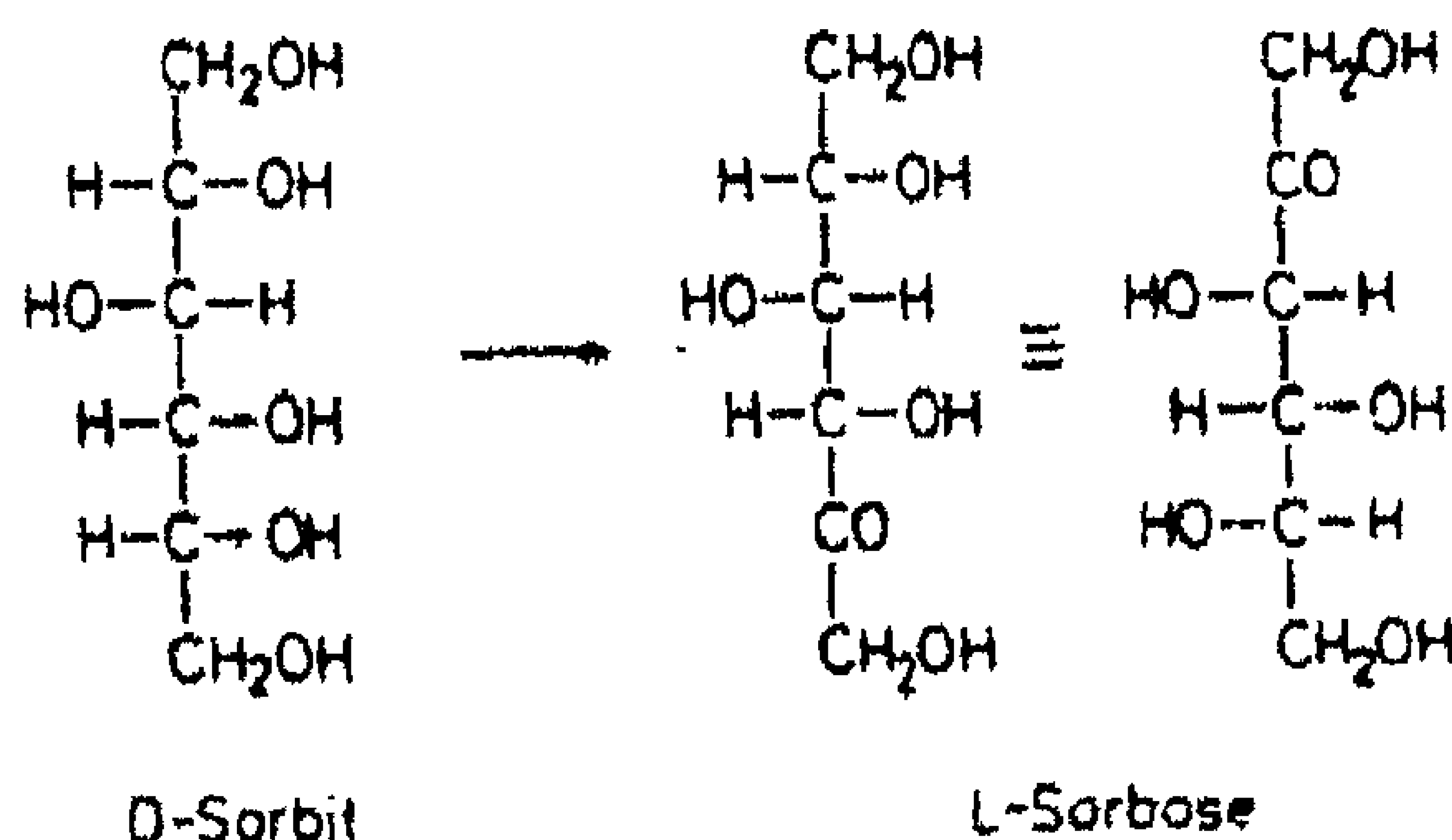
يتحلل H_2O_2 الناتج بفعل انزيم الكاتالاز Catalase لبكتريا حامض الخليك الهوائية كالآتي:



$$(122\text{-}3)... \quad 2H_2O_2 \xrightarrow{\text{أنزيم الكاتالاز}} 2\,H_2O + O_{2+}$$

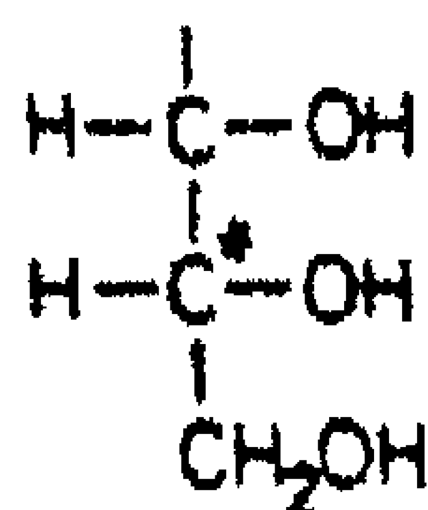
أكسدة Sorbit — D إلى L-Sorbose:

إضافة إلى دور بكتريا حامض الخليك في إنتاج " الخل"، تقوم هذه البكتريا وبالذات Acetobacter suboxydans بتفاعل آخر مهم في المايكروبايولوجي الصناعي وهو تحول D- sorbit إلى L-Sorbose وهذه مرحلة وسطية مؤدية إلى تخليق فيتامين C.



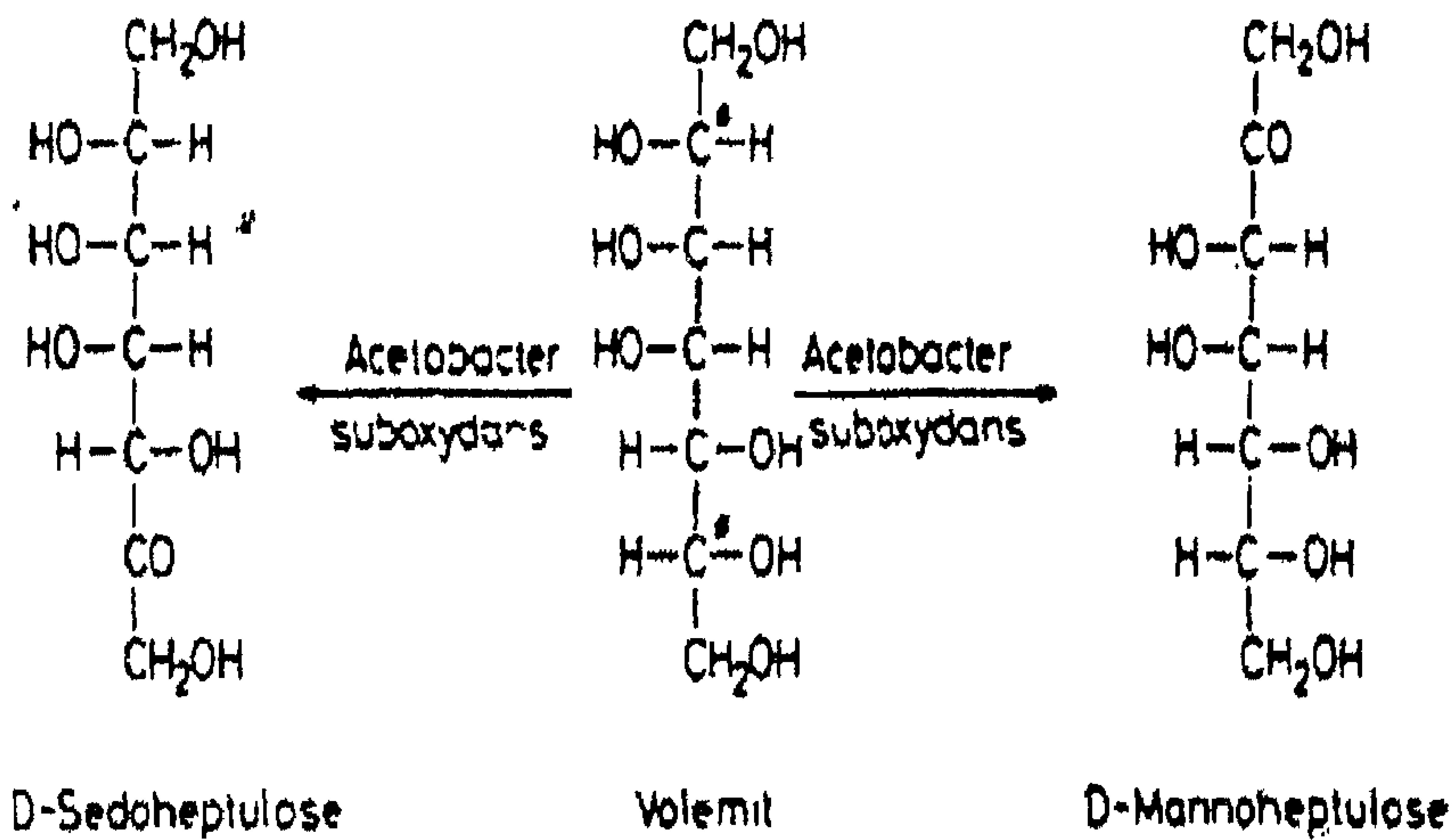
(123-3) ...

تؤكسد البكتريا Acetobacter suboxydans أيضا مركبات أخرى مثل Polyol إذا احتوى التركيب الآتي:



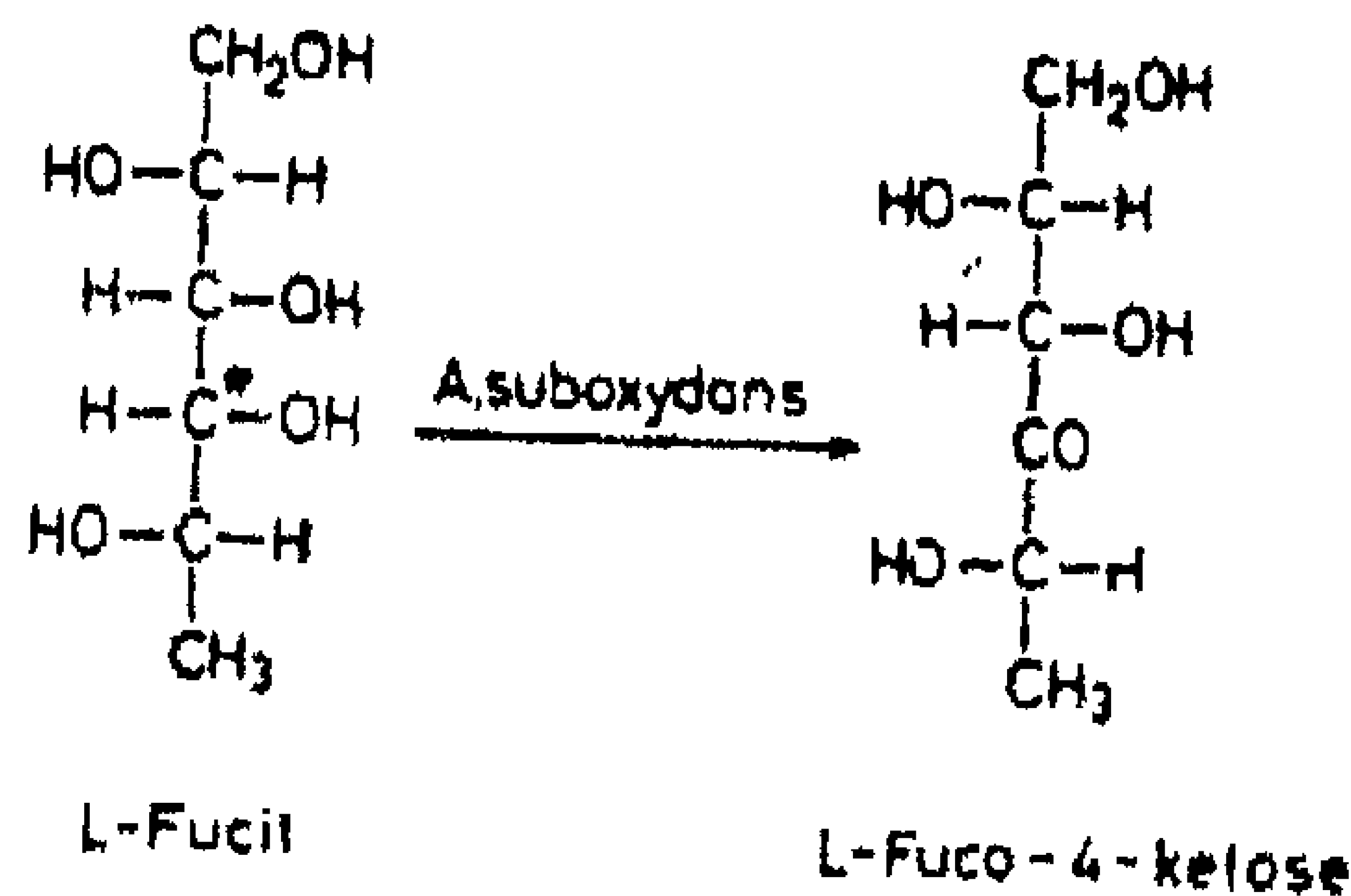
يتأكسد المركب Polyol في ذرة الكربون الموسومة (❖) بواسطة البكتريا المذكورة ويتحول بذلك إلى كيتوز معين من الشروط الواجب توفرها في ال Polyol ليكون ركيزة Substrate أن يحتوي على مجموعتي هيدروكسيل ثانويتين في حالة Cis ومجاورتين لمجموعة هدروكسيل أولية حسب قاعدة بير تراند- هدسون (Bertrans Hudson rule)

ولإثبات قاعدة Hudson بذكر المثال الآتي:



(124-3) ...

يطابق المركب Volemit قاعدة هدسون في نقطتين (*) وبذلك يتكون ناتجان مختلفان نتيجة أكسدة هذا المركب بواسطة البكتريا Acetobacter suboxydans ويمكن عزل المركبين الناتجين عن بعضهما عمليا وهما D- Monnoheptulose D- sedoheptulose يمكن أن تشمل قاعدة هدسون إلى حد ما أكسدة المركب W-Deoxy- sugar فمثلا يؤكسد L-Fucit إلى L-Fuco-4- ketose بواسطة البكتريا المذكورة أعلاه.



(125-3) ...

في هذه الحالة والحالات المشابهة يجب النظر إلى المجاميع CH_3- CHOH وكأنها امتداد للمجاميع CH_2OH، ومع هذا فهناك أمثلة أخرى معروفة عن سكريات مثيلية لا يمكن أكسدتها حتى لو انطبقت عليها قاعدة بيرتراند هدسون.

يوجد الأنزيم Polyol dehydrogenasc ايضا في أحياء مجهرية أخرى وحيث لا يطابق عمله قاعدة بيرتراند هدسون. يوضح الجدول 3-9 تخصص الأنزيمات Polyol dehydrogenase ومصادرها وتركيب الركائز التي تعمل عليها.

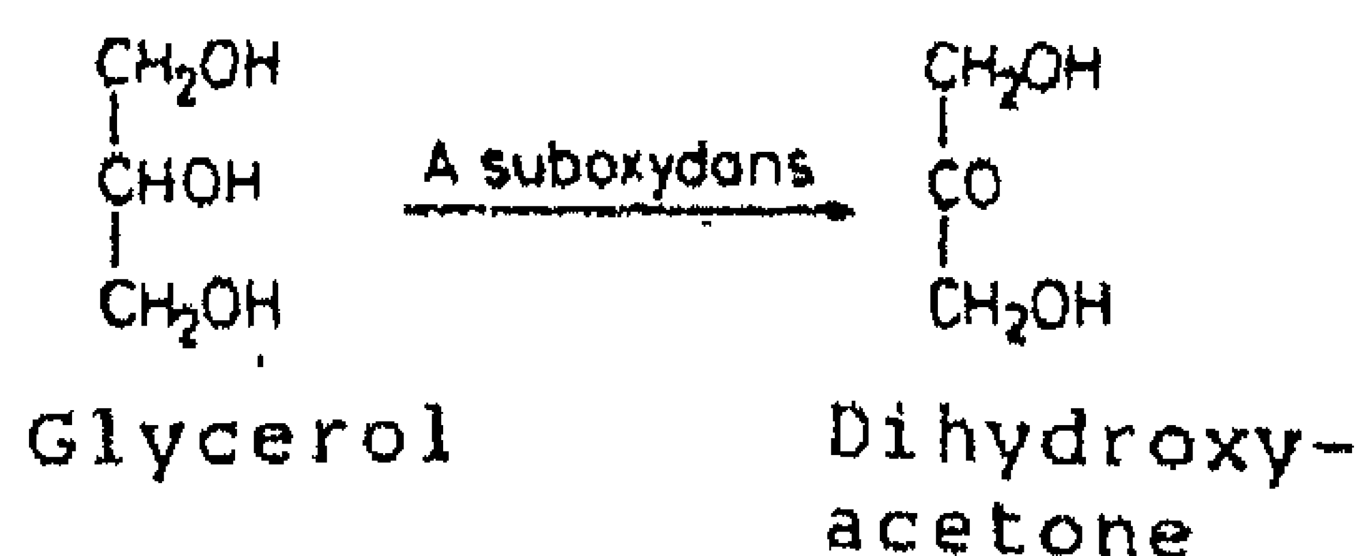
جدول 3-9: تخصص الأنزيمات Polyol dehydrogenase ومصادرها وتركيب الركائز التي تعمل عليها.

التركيب الالتزامي للركيزة	مصدر الانزيم	الصفات	التميم الانزيمي	الانزيم
CH_2OH … CH_2OH	A suboxydans	pH - 0pt. 5.5	cytochrome	D-mANNIT-Dehydrogenase (Bertrand- Hudson-Enzyme)
CH_2OH … CH_2OH	A suboxydans	ذائب	NAD^+	D-mANNIT-Dehydrogenase (Bertrand- Hudson-Enzyme)
CH_2OH … CH_2OH	Azotobocter agilis	ذائب pH - 0pt. 7.8	NAD^+	D-mANNIT-Dehydrogenase (Bertrand- Hudson-Enzyme)

التركيب الالتزامي للركيزة	مصدر الانزيم	الصفات	التميم الانزيمي	الانزيم
CH_2OH CH_2OH	Aerobacter aerogenes	ذائب	$NADP^+$	D- Arabitt- Dethydrogense Bertad- Hudsen - Enzyme)
CH_2OH CH_2OH	Aerobacter aerogenes	ذائب	NAD^+	D-Ribit- Dehydrogenase (Bertrand- Hudson- Enzyme)
CH_2OH CH_2OH	Pseudomonas sp.	ذائب	NAD^+	D-mANNIT- Dehydrogenase
CH_2OH CH_2OH	Pseudomonos sp.	ذائب	NAD^+	D-mANNIT- Dehydrogenase
CH_2OH CH_2OH	Rattenleber Azotobocter	ذائب	NAD^+	L-Neft- Dehydrogenase

تأكسد الكلسيرول إلى ثنائي هدروكسيل الاستون :

يمثل تأكسد الكلسيرول إلى ثنائي هدروكسيل الاستون تفاعلا أخر مهما في تكنولوجيا الغذاء ويتم بواسطة بكتريا حامض الخليك أيضاً ويستخدم الناتج للمصابين بداء السكر. لا تطابق الأكسدة في هذا التفاعل قاعدة هدسون ويحصل التفاعل بوجود أنزيم مختلف عما ذكر في الجدول (3-9)



(126-3) ...

يمكن أن يتكون ثنائي هدروكسيل الاستون نتيجة للأكسدة المباشرة للكلسيرول التي تتم في pH مثالية تعادل (6)، وفي غياب نيوكليوتيد البريدين والفسفات اللاعضوية Pi. ومن جهة أخرى يتكون ثنائي هدروكسيل الاستون في الرقم الهدروجيني 8.5 أيضاً وبوجود ATP وأيونات Mg^{+2} ويحصل هذا بتحول الكلسيرول أولاً إلى كلسيرول −1− فسفات ويتأكسد الأخير بوجود NAD-specific dehydrogenase إلى فسفات ثنائي هدروكسيل الاستون. تثبط أكسدة الكلسيرول إلى ثنائي هدروكسيل الاستون بوجود -2.4 Dinitrophenol وهذا المركب يؤدي إلى فصل الفسفرة عن السلسلة التنفسية وبذلك لا يتكون ATP. يثبط هذا المركب كذلك أكسدة ثنائي هدروكسيل الاستون في مراحل تالية من دورة فسفات البنتوز.

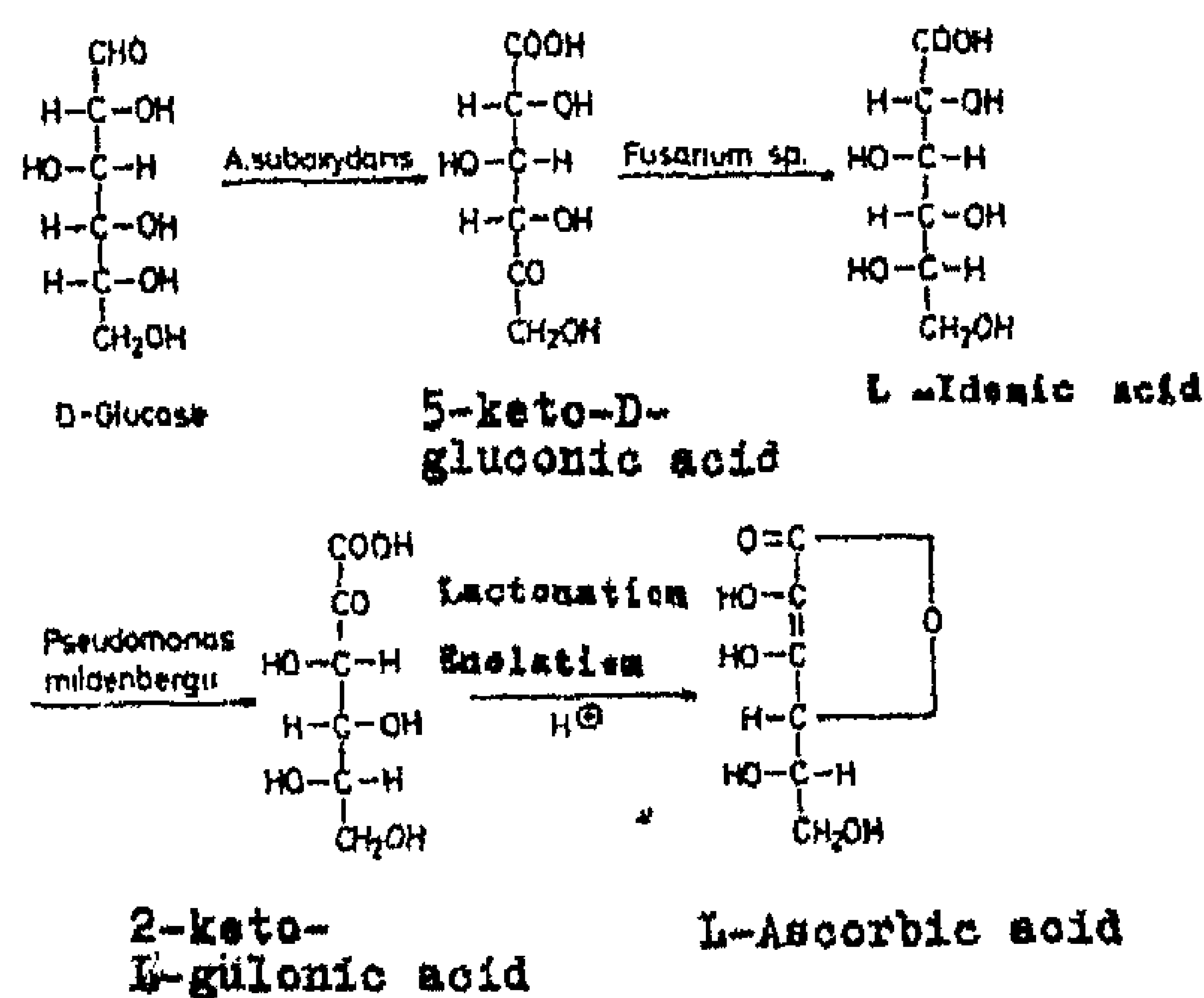
أكسدة الكلوكوز إلى حامض الكلوكونك:

إن أكسدة السكريات المختزلة من قبل أنواع جنس البكتريا Acetobacter أو من قبل أحياء مجهرية أخرى، مهم جداً في تكنولوجيا الأغذية كتحول الكلوكوز إلى حامض الكلوكونك الذي ذكر سابقاً (انظر فعل الأنزيم Glucose oxidase في الفصل الأول). تستعمل في الصناعة أنواع من جنس البكتريا Acetobacter ويفضل استخدام Aspergillus niger في التكنولوجيا.

أكسدة الكلوكوز إلى 5. keto-D- gluconic acid.

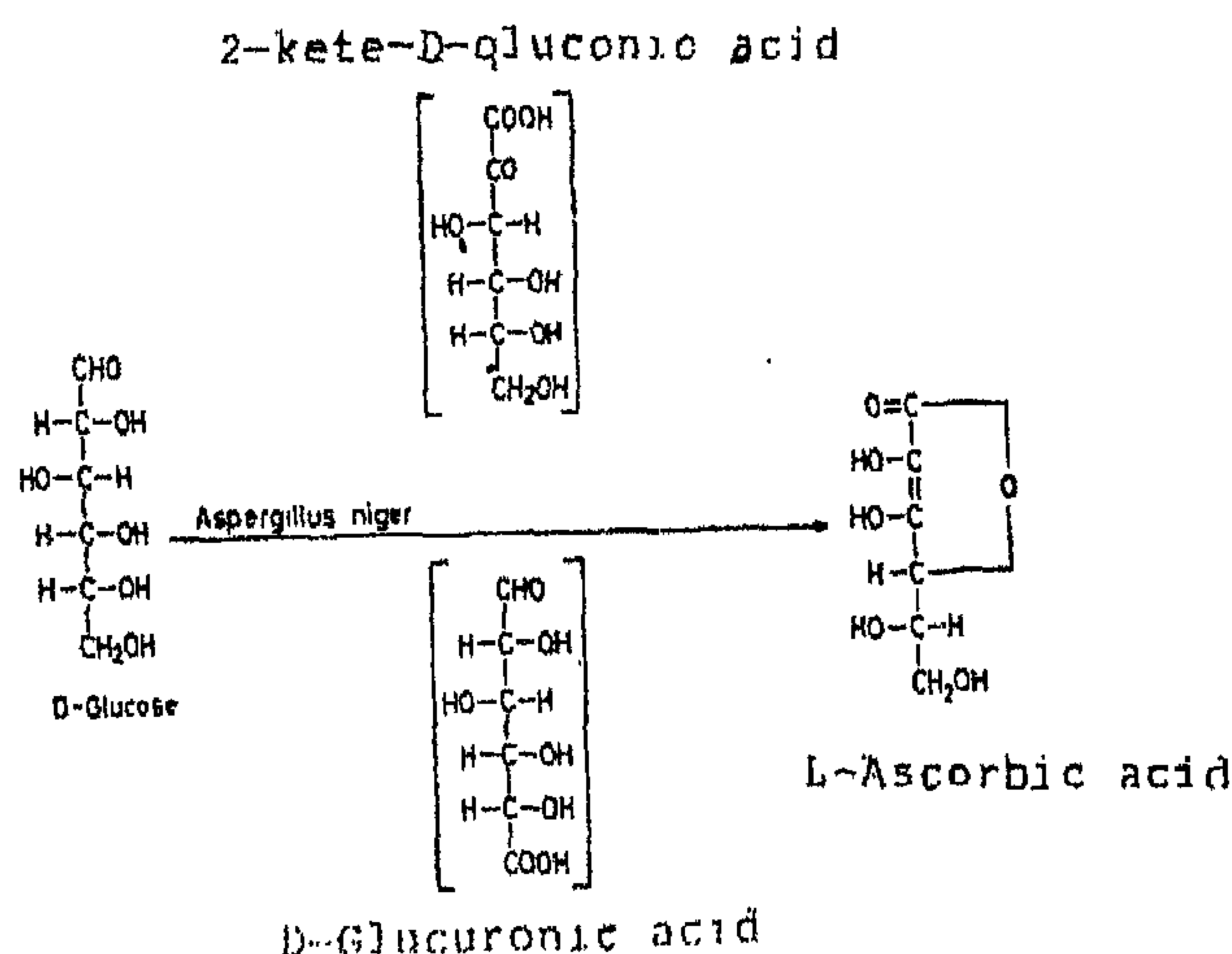
تتم هذه الأكسدة في البكتريا A.suboxydans وتعد مهمة جداً على أنها خطوة أولية في تخليق حامض الإسكوربك L-Ascorbic acid بطريقة الإختمار. وفي الخطوة الثانية يختزل keto-D-gluconic acid-5 بواسطة نوع مختار من جنس ال Fusarium إلى Idonic acid L- يتأكسد المركب الأخير إلى keto-L-gulonic acid-2 بواسطة pseudomonas mildenbergli وهذا المركب يتحول إلى حامض الإسكوربك عند جعل المحيط حامضياً (شكل 3-40).

ولا يستبعد تخليق حامض الإسكوربك بخطوة تخميرية واحدة فقط من الكلوكوز باستعمال سلاسلات مختارة من Aspergillus niger.



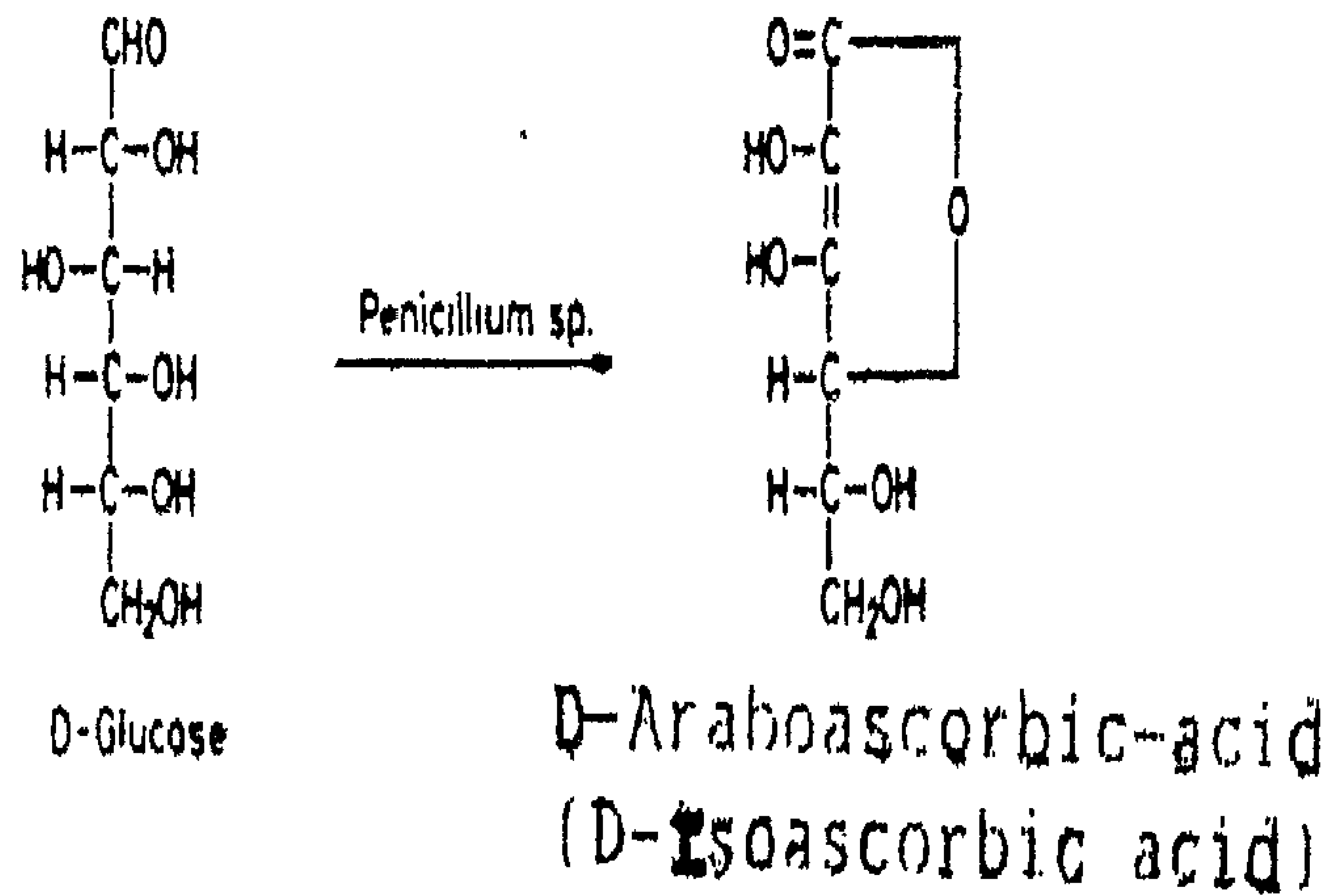
شكل (3-40) تكوين حامض الأسكوربك من الكلوكوز بواسطة الأحياء المجهرية.

يمكن لبعض السلالات المختارة من A.niger والمنتجة لحامض الستريك، بناء كميات قليلة من حامض الإسكوربك في أوساط زرعية معينة وفي هذه الحالة يمثل تكوين المركب 2-ketogluconic acid أو Gluconic acid خطوة سابقة لتكوين حامض الإسكوربك وكما يأتي:



(127-3) ...

يمكن لبعض الأنواع المختارة من جنس الPenicillium تخليق حامض D-Isoas- Cerbic acid من سكر الكلوكوز ويمكن إنتاج الحامض بنسبة 40٪ من السكر المستعمل



(128–3) ...

يمتلك D-Araboascorbic acid عادة $\frac{1}{20}$ من فعالية فيتامين C التي يمتلكها L-Ascorbic. ويستخدم D-Araboascorbic مانعاً للأكسدة ويعد مهماً في معامل تصنيع الأغذية.

3-2 المصادر المعتمدة

1. Rehm,H.J. Industrielle Mikrobiologie. Springer Berlin-Heidelberg-New York,1967.
2. Rudy.H. Fruchtsaeren wissenschaft und Technik, Alfred Huethig Verlag, Heidelberg. 1967
3. Shelgel.H.G. Allgemeine Mikrobiogogie, Thieme, Stuttgart, 1969.
4. Gray, C.J. Enzyme. Catalysed reactions. Van Nestrand Reinhold comp. London, 1971.
5. Karlson, p.Biochemie. Georg thieme Velag stgt 1972.
6. Lloyd, D. The Mitechendria of Microorganisms, Academic press. London New York. 1974.
7.Cunningham, E.B iochemistry, Mechanism of Metabolism, Mcgrow-Hill Book Company, 1978
8.Bruchmann. E-E. Angewante Biochemic Velag Eugen ulmer stuttgrat, 1979.
9. Heimann, W. Fundamentals of Food Chomistry. Ellis Hokwood Publishers. 1980.
10. Belitz. H. D. of Grosch. W. Lehrbuch des Lebensmittelchemie Zweite Auflage. Springer Verlag. 1985

11. Rassam M.B. & Dawood, N.S. Purification and properties of cytochrome C[sss] from Leishmania donovani. Melecular and Bio-chemical Pararsitology, 21.1-6. 1986.

12. Rassam, M.E. Shanshal, M. & Gargess, G.S. Isolation and Identification of coenzume Q from Leishmania donovani. Molecular and Biochemical Parasitology, 29.61-64,1988.

الفصل الرابع

الشحوم Lipids

الفصل الرابع

الشحوم Lipids

4-1 المقدمة

تمثل الشحوم مجموعة غير متجانسة بوصفها مركبات كيميائية تجمعها خاصية عدم الذوبان في الماء نظراً لطبيعتها الهدروفوبية Heydrophobic فيما تكون قابلة للذوبان في المذيبات غير القطبية كالأثير والكلوروفورم والبنزين.

ويمكن تصنيف الشحوم إلى

1. أستلات الكلسيرول Acyl glycerels
2. الشموع Waxes
3. الشحوم الفسفاتية Phospholipids
4. الشحوم السفنكولية Sphingolipids
5. الشحوم السكرية Glycolipids
6. الكيلات كلسيريدات الإيثرات Alkyl glycerly ethers
7. الشحوم التربينية Terpenoid lipids وتضم الكاروتينويدات والسترويدات وتنتشر جميع هذه الأصناف في الطبيعة.

4-2 الحوامض الدهنية

تقترن معظم الشحوم بحوامض دهنية وهي حوامض كربوكسيلية تحتوي على عدد مزدوج لذرات الكربون يتراوح بين 4 و30 ذرة وتكون عادة في سلسلة مستقيمة. تكون الحوامض الدهنية ذات المصدر الحيواني مستقيمة السلسلة

وتتكـون مـن 16-22 ذرة كربـون وقـد تكـون مـشبعة أو حاويـة علـى عـدد مـن الأواصر المزدوجة يتراوح بين 1 و6.

أمـا الحـوامض الدهنيـة الموجـودة في البكتريـا فهـي أكثـر اختلافـاً في التركيب عما هو موجود في الحيوانات. فقد تكون مشبعة أو حاوية على آصرة مزدوجة واحدة وقد تكون متشبعة السلسلة وفي بعض الأحيان قد تدخل حلقة البروبان الحلقي Cycloprophane في تركيبها كما في الحامض لاكتوباسلك Lactobcillic.

وتتكـون الحـوامض الدهنيـة النباتيـة أكثـر تغـايراً وقـد تحـوي أواصـر استيلينية أو مجاميع ايبوكسي Epoxy أو هدروكسي أو كيتو أو بروتين حلقي cyclopropene أو بينتين حلقي Cyclopentene

ويوضح الجدول (4-1) تركيبات الحوامض الدهنية الشائعة.

جدول (4-1) تركيبات الحوامض الدهنية الشائعة

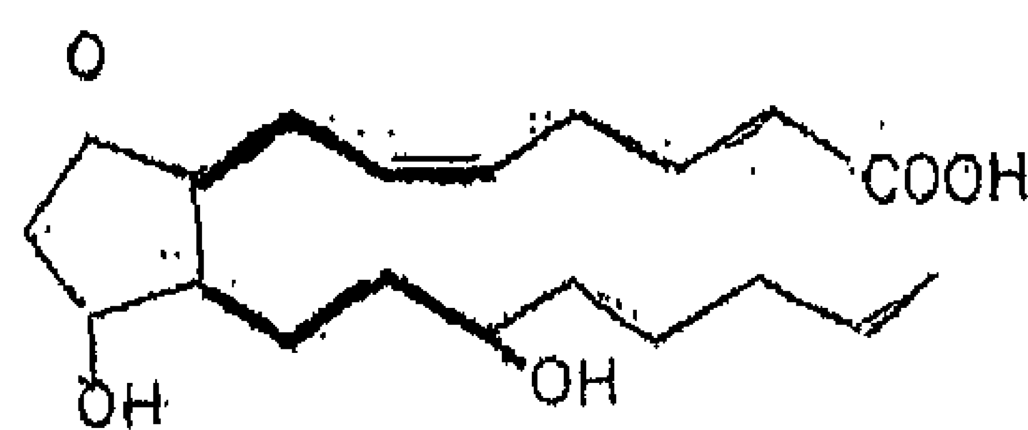
الحامض		التركيب	درجة الانصهار
الحوامض الدهنية المشبعة	Saturated fatty acids		
حامض الخليك	Acetic acid	CH_3COOH	16
حامض البروبيونك	Propionic acid	$CH_3\ CH_2COOH$	22-
حامض البيوترك	Butyric acid	$CH_3\ (CH_2)_2COOH$	7.9-
حامض الكبروك	Capronic acid	$CH_3\ (CH_2)_4COOH$	3.4-
حامض الديكانوك	Decanoic acid	$CH_3\ (CH_2)_8COOH$	32
حامض اللورك	Laturic acid	$CH_3\ (CH_2)_{10}\ COOH$	44
حامض المرستك	Myristic acid	$CH_3\ (CH_2)_{12}\ COOH$	54
حامض البالمتك	Palmitic aicd	$CH_3\ (CH_2)_{14}COOH$	63
حامض السيتارك	Stearic acid	$CH_3\ (CH_2)_{16}COOH$	70
حامض الاراكوك	Arachidic acid	$CH_3\ (CH_2)_{18}COOH$	75

الحامض	التركيب	درجة الانصهار(م)

تابع الجدول ٤ – ١

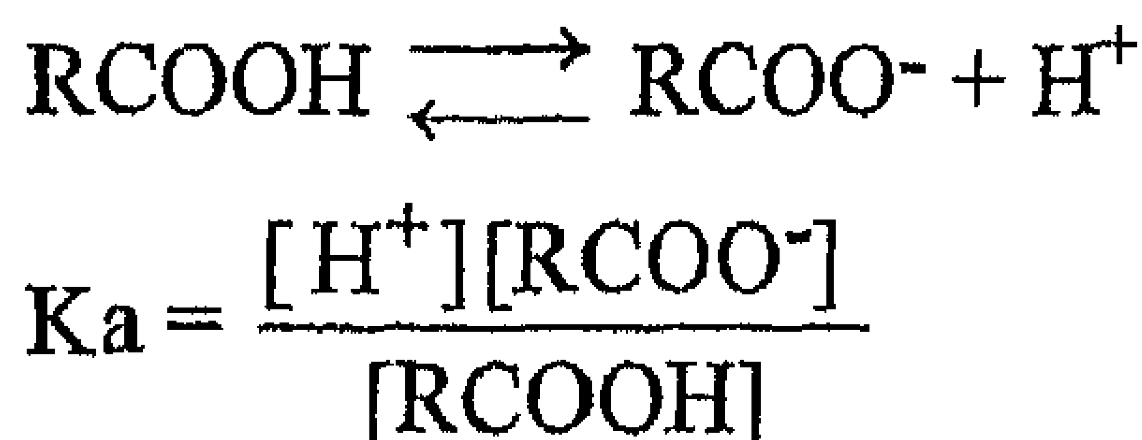
الحامض	التركيب	درجة الانصهار (م)
حامض البهنك Behenic acid	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	–80
حامض اللكنوسرك Lignoceric acid	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	–84
Monoenoic fatty acids الحوامض الدهنية احادي الآصرة المزدوجة		
Oleic acid	$CH_3(CH_2)_7CH \overset{cis}{=} CH(CH_2)_7COOH$	–13
cis – Vaccenic acid	$CH_3(CH_2)_5CH \overset{cis}{=} CH(CH_2)_9COOH$	–44
الحوامض الدهنية ثنائية الآصرة المزدوجة Dienoic fatty acid Linoleic acid	$CH_3(CH_2)_4(CH \overset{cis}{=} CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$	– 5
الحوامض الدهنية ثلاثية الآصرة المزدوجة Trienoic fatty acids α – Linolenic acid	$CH_3CH_2(CH \overset{cis}{=} CHCH_2)_3(CH_2)_6COOH$	–10
الحوامض الدهنية رباعية الآصرة المزدوجة Tetraenoic fatty acid Arachidonic acid	$CH_3(CH_2)_4(CH \overset{cis}{=} CHCH_2)_4(CH_2)_2COOH$	–50
الحوامض الدهنية غير الشائعة Unusual fatty acids		
α-Elaeostearic acid	$CH_3(CH_2)_3CH \overset{trans}{=} CHCH \overset{trans}{=} CHCH \overset{cis}{=} CH(CH_2)_7COOH$ (conjugated)	48
Tariric acid	$CH_3(CH_2)_{10}C \equiv C(CH_2)_4COOH$	51
Isanic acid	$CH_2{=}CH(CH_2)_4C \equiv C{-}C \equiv C(CH_2)_7COOH$	39
Lactobacillic acid	$CH_3(CH_2)_5\overbrace{CH{-}CH}^{CH_2}(CH_2)_9COOH$	28
Varnolic acid	$CH_3(CH_2)_4\underbrace{CH \overset{cis}{-} CH}_{O}CH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	—

البروستكلندينات Prostaglandin (PGE$_2$)



4-2-1 الخواص الفيزيائية

تتأين الحوامض الدهنية الحرة في الماء:



$$RCOOH \rightleftharpoons RCOO^- + H^+$$

$$Ka = \frac{[H^+][RCOO^-]}{[RCOOH]}$$

وإذ أن pka = logka - فأن قوة الحامض تحدد بتأينه. وتكون pka لمعظم الحوامض الدهنية في المدى 4.76-5.0. وتمتلك الحوامض القوية قيم pk4 أعلى.

ونظرا لأن جزيئات الحوامض الدهنية تتكون من جزء كارة الماء Hydrophobic هو السلسلة الهدروكربونية وآخر محب للماء (هدروفيلي) وهو المجموعة الكربوكسيلية، تسمى هذه الجزيئات أمفيباثية Amphipathic وتميل الأجزاء الامفيباثية إلى التآثر مع بعضها فيما تتآثر الأجزاء الهدروفيلية مع المحيط المائي ونتيجة لهذه الصفات تميل الحوامض الدهنية إلى التجمع بأسلوب معين لتكوين مذيلات Micelles، وسوف نتطرق إلى أهمتيها فيما بعد. وتعكس الحوامض الأخرى للحوامض الدهنية طبيعة سلاسلها الهدروكربونية وتكون الحوامض الدهنية الحاوية على ما لايزيد على 8 ذرات كربون في السلسلة الهدروكربونية سائلة فيما تكون الحوامض المشبعة الحاوية على عدد أكبر من ذرات الكربون صلبة: يمتلك حامض السيتارك $CH_3\ (CH_2)_7$ درجة انصهار 70°م. وعند إدخال آصرة مزدوجة كما في حامض الأوليك

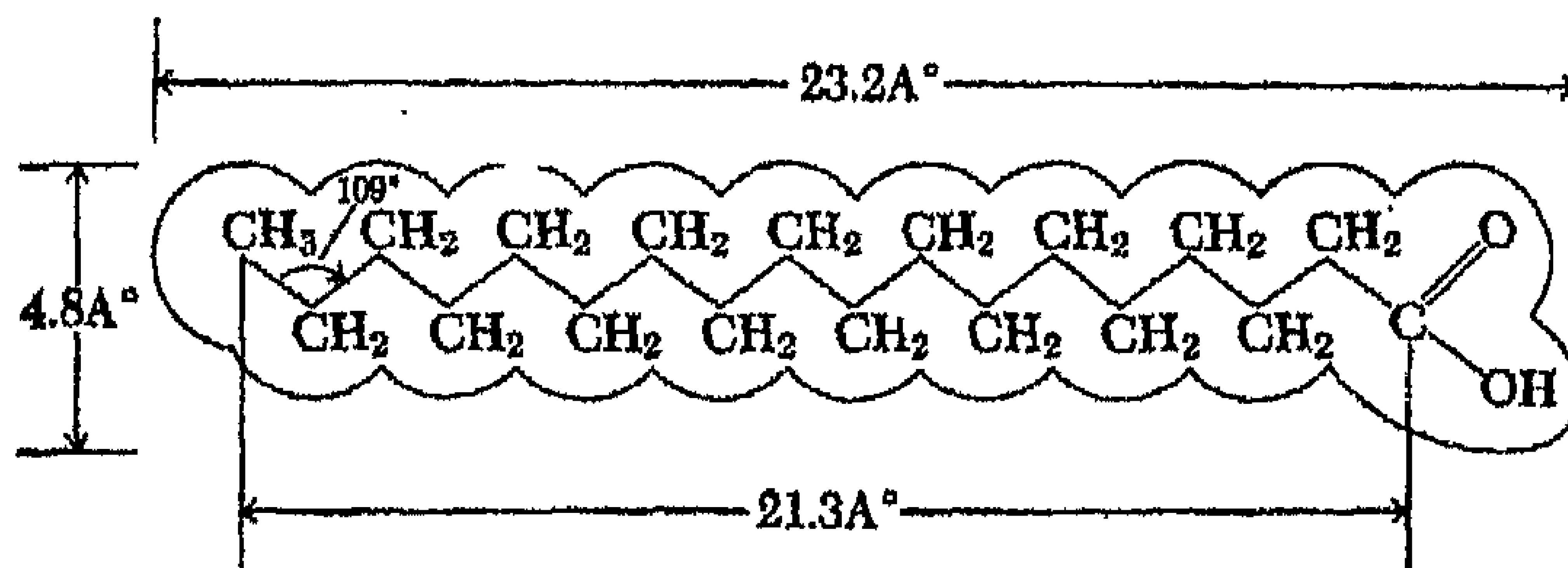


$CH_3\ (CH_2)_7CH{=}\ CH(CH_2)_7\ COOH$ تنخفض درجة الإنصهار إلى 14°م.

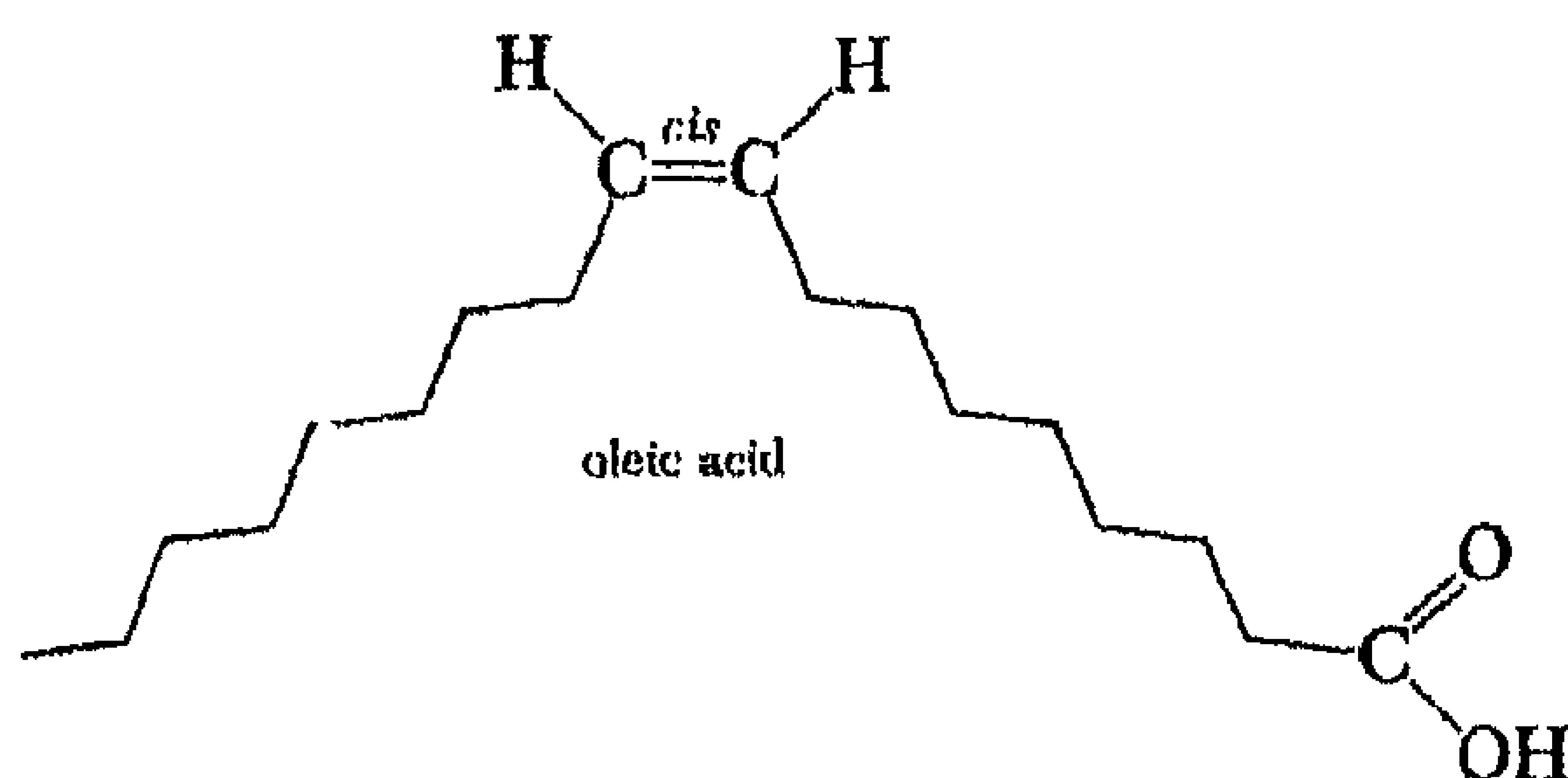
كما أن إدخال عدد أكبر من الأواصر المزدوجة يقلل درجة الانصهار إلى اوطأ من ذلك.

تكون معظم الحوامض الدهنية غير المشبعة الموجودة في الطبيعة بصيغة المقرون Cis الأقل ثباتا من صيغة المفروق Trans.

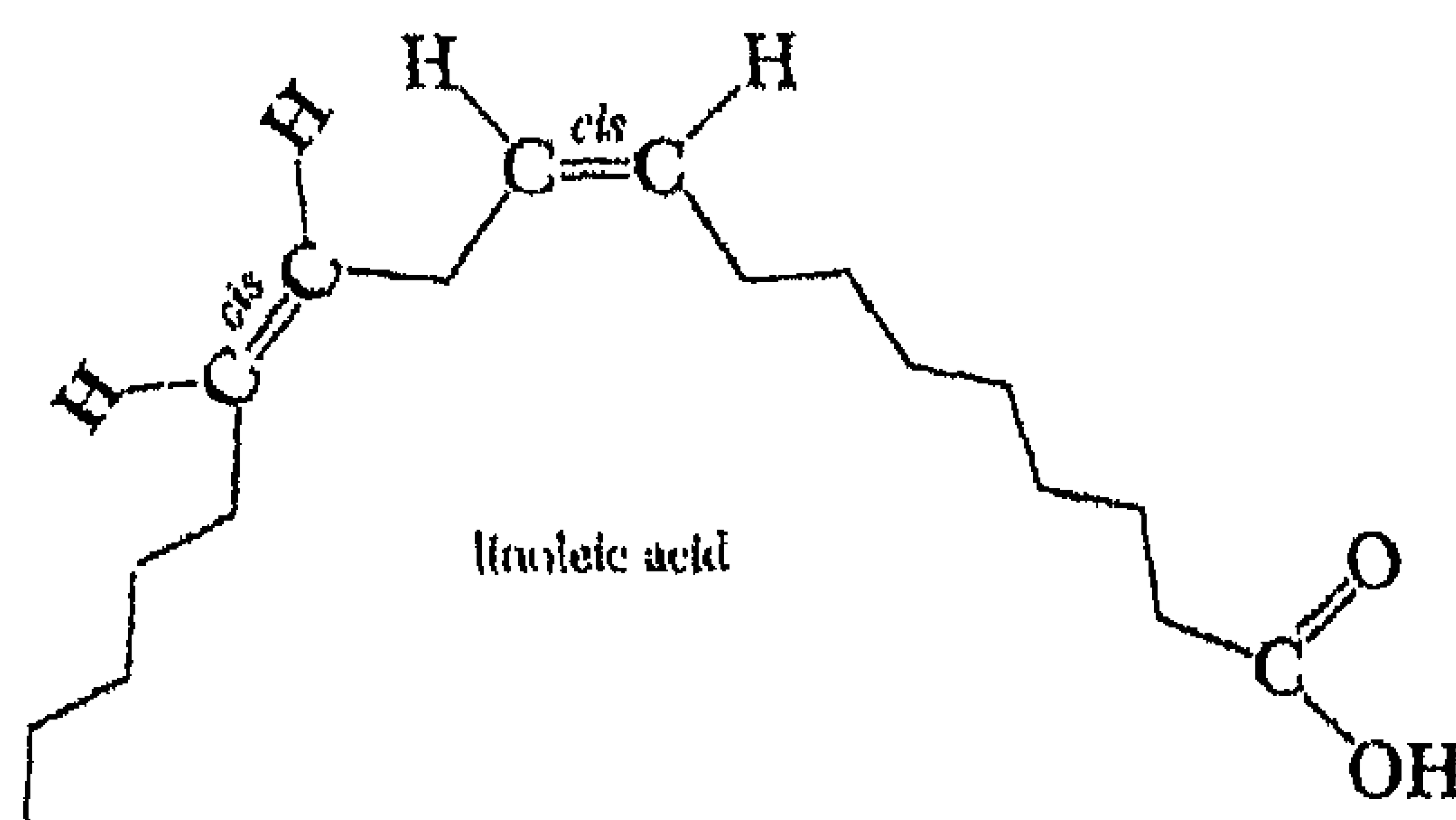
تمتلك السلسلة الهدروكربونية للحامض الدهني شكل خط متعرج Zigzag وتشكل اواصر كاربون-كاربون زاوية 109°م.



وعند وجود آصرة مزدوجة من نوع Cis في الموقع 9-10 كما في حامض الأوليك، تتخذ الجزيئة الشكل الموضح أدناه إذ أن الآصرة المزدوجة تؤدي إلى انحناء الجزيئة.



ويكون الانحناء أكثر في حالة وجود آصرتين مزدوجتين كما في حامض اللنوليك ومن الجدير



بالذكر انتشار الحوامض الدهنية الحاوية على أكثر من آصرة مزدوجة في أغشية الخلايا الحيوانية والنباتية فيما لاتحتوي البكتريا على حوامض دهنية عديدة الأواصر المزدوجة، ويكون الحامض الدهني الرئيسي غير المشبع في البكتريا هو حامض فاكسنك Vaccenic



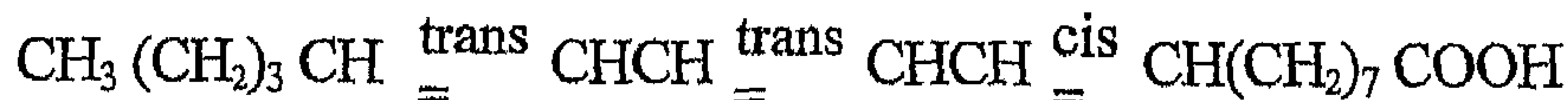
$$CH_3—(CH_2)_5—CH=CH(CH_2)_9—COOH$$

إضافة إلى ما تقدم، تكون الأواصر المزدوجة غير متبادلة nonconjugated في الحوامض الدهنية المنتشرة في الطبيعة وكمثال حامض اللنوليك حيث تفصل مجموعة مثيلين بين الأواصر المزدوجة:



$$—CH_2—CH=CH—CH_2—CH=CH—CH_2—$$

إلا أن الحامض الدهني المهم صناعيا α-Elaeosteraic الذي يشكل الحامض الرئيس في زيت التانغ Tung oil يمثل زمير لحامض الفا- لنولنيك ويختلف عنه باحتوائه على نظام ثلاثي الأواصر المزدوجة المتبادلة:



$$CH_3(CH_2)_3CH \overset{trans}{=} CHCH \overset{trans}{=} CHCH \overset{cis}{=} CH(CH_2)_7COOH$$

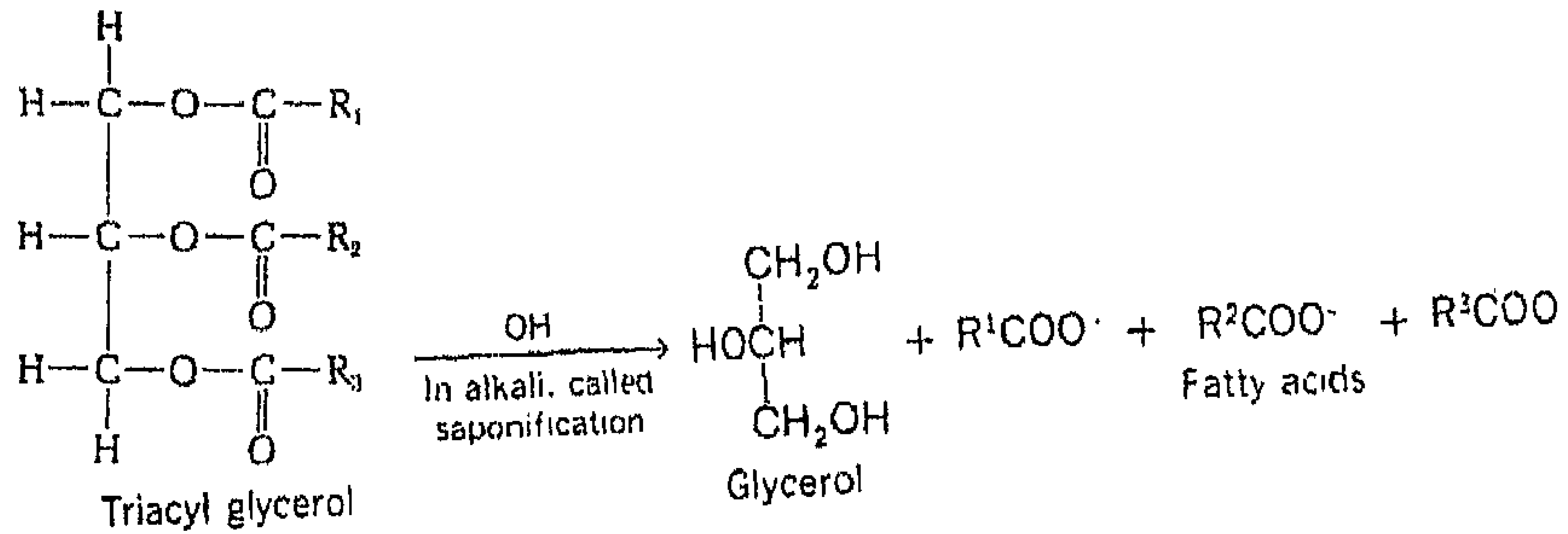
ويكون الحامض أكثر فعالية من زميره الفا- لنولينك بسبب تبادل الأواصر المزدوجة حيث يسهل بلمرته polymerization.

وتستخدم هذه الخاصية في صناعة الأصباغ.

4-2-2 الخواص الكيميائية

تعكس الفعاليات الكيميائية للحوامض الدهنية فعالية مجموعة الكربوكسيل ودرجة عدم تشبع السلسلة الهدروكربونية. ونظرا لكون الحوامض الدهنية سامة فإن وجودها بصورة حرة محدود جدا في الخلية. وتوجد هذه الحوامض عادة مرتبطة بشكل استرات في الشحوم المعقدة مثل ثلاثيات اسيل الكلسيرول والشحوم الفسفاتية.

تتحلل الأواصر الاستر مائيا بوجود حامض أو قاعدة ويختلف التحلل المائي بوجود الحامض عنه بوجود القاعدة بكون الأول عكوس والثاني غير عكوس والسبب يعود إلى أن الحامض الدهني الناتج عن التحلل المائي بوجود القاعدة يكون أنيون تام التأين ولا يميل للتفاعل مع مجموعة الهدروكسيل:



حوامض دهنية   كلسيرول   ثلاثي أسيل الكلسيرول   الكلسيرول

وتسمى عملية التحلل المائي بوجود قواعد قوية (صوبنة) حيث تتم العملية بوجوج هدروكسيل الصوديوم أو البوتاسيوم المركز الساخن وينتج عن ذلك ملح الفلز القلوي للحامض الدهني أي ما يسمى (الصابون) إضافة إلى الكلسيرول.

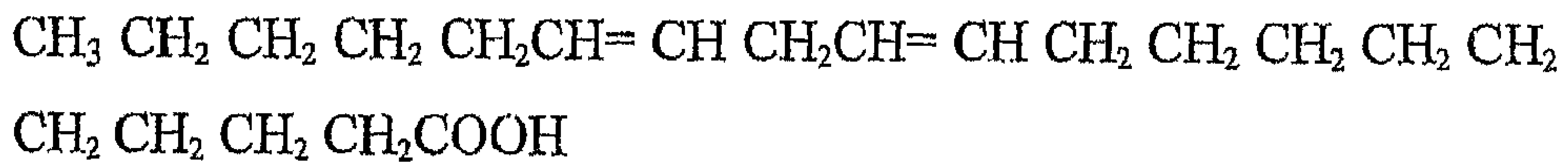
ويعرف رقم الصوبنة Saponification number بأنه عدد ملغرامات هدروكسيد البوتاسيوم الضرورية لصوبنة غم واحد من الدهن أو الزيت ويتناسب عكسيا مع الوزن الجزيئي للدهن أو الزيت.

تعاني الحوامض الدهنية غيرالمشبعة تفاعلات إضافة ويعبر عن تفاعل الدهن أو الزيت مع اليود برقم اليود للنموذج ويعرف بأنه عدد غرامات اليود (I_2) التي ترتبط مع 100 غم من الدهن وبهذا يكون رقم اليود مقياساً لقلة التشبع في النموذج ويزداد تبعا لذلك.

3-2-4 التسمية Nomenclature

يمكن استخدام الرموز لوصف الحوامض الدهنية، والقاعدة العامة هي كتابة عدد ذرات الكربون أولاً ثم عدد الأواصر المزدوجة واخيرا موقع أول ذرة كربون مرتبطة بالآصرة المزدوجة ابتداء من مجموعة الكربوكسيل. وهكذا يكتب حامض البالمتك المشبع والمكون من 16 ذرة كربون 16:0 وحامض الاوليك 18:19 وحاض الاراكدونك (5.8.11.14) 20:4 ويفترض بأن الزمير المقرون Cis مقصود بهذه الصيغة. أما إذا وجد الزمير المفروق trans فيكتب الحرف (t) بجوار موقع الآصرة المزدوجة المعنية والحرف (C) بجوار موقع الآصرة المزدوجة من نوع Cis وكمثال (6t, 9t, 12c) 3 :18.

وهناك أسلوب آخر لوصف الحوامض الدهنية عديدة الأواصر المزدوجة نسبة إلى مجموعة المثيل الطرفية. وهكذا يعبر عن حامض اللنوليك: (9,1218)2: أو 18(n-6)2: حيث تمثل n عدد ذرات الكربون في الجزيئة والرقم 6 يشير إلى أن اول آصرة مزدوجة تكون ذرة الكربون السادسة ابتداء من مجموعة المثيل الطرفية وأما الأصرة المزدوجة الثانية فتتبع قاعدة عدم تبادل الأواصر المزدوة من نوع Cis نسبة للآصرة الأولى وبذلك يكون(n-6)220: كما يأتي


CH_3 CH_2 CH_2 CH_2 $CH_2CH=$ CH $CH_2CH=$ CH CH_2 CH_2 CH_2 CH_2 CH_2
CH_2 CH_2 CH_2 CH_2COOH

ويمكن وصفه كذلك (11.1420)2:

3-4 أسيلات الكلسيرول Acyl glycerols

تكون ثلاثيات اسيل الكلسيرول أكثر اسيلات الكلسيرول إنتشاراً وصيغتها العامة كالآتي:

تسمية ذرات الكربون

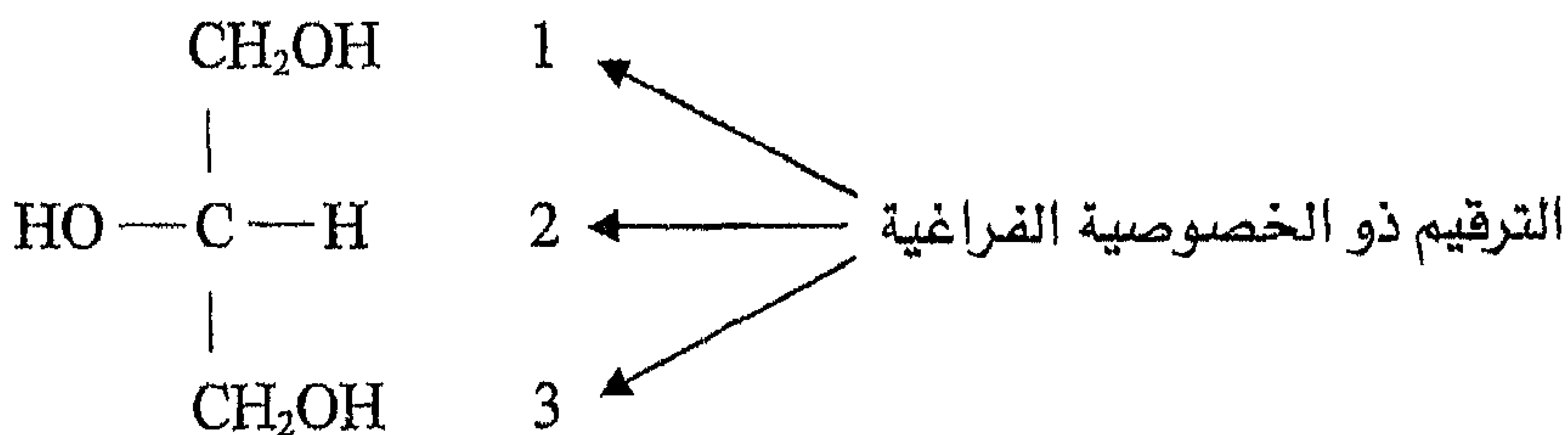
1 أو α	CH_2OCR_1
2 أو β	R_2COOH
3 أو α	CH_2OCOR_3

Tracyl glycerol

لا توجد ثنائيات وأحاديات اسيل الكلسيرول بكميات ملحوظة في الطبيعة إلا أنها تمثل مركبات وسطية مهمة في تفاعلات التخليق وتكون تراكيبها كما يأتي:

CH_2OH $RCOOCH$ CH_2OH 2 Monoacyl glycerol	CH_2OCOR^1 $HOCH$ CH_2OH 1 Monoacyl glycerol	CH_2OCOR^1 R^2COOCH CH_2OH 1,2, Diacyl glycerol
-أحادي أسيل الكلسيرول	١ – أحادي اسيل الكلسيرول	١ ، ٢ – ثنائي أسيل الكلسيرول .

يلاحظ في أسلوب التسمية أعلاه ترقيم ذرات الكربون الكلسيرول 1،2،3 ، إن الأرقام 1و 3 لا يمكن مبادلتها تبعاً لأسلوب التسمية المتبع من قبل هيأة الايوباك IUPAC-IUB حيث تكون مجموعة الهدروكسيل على ذكرة الكربون الثانية للكلسيرول على يسار الصيغة التركيبة حسب تمثيل فشر للجزيئة وبذلك تكون ذرة الكربون العليا: C-1 والسفلى: C-3 ويطلق على نظام الترقيم هذا: الترقيم ذوالخصوصية الفراغية stereospecific.

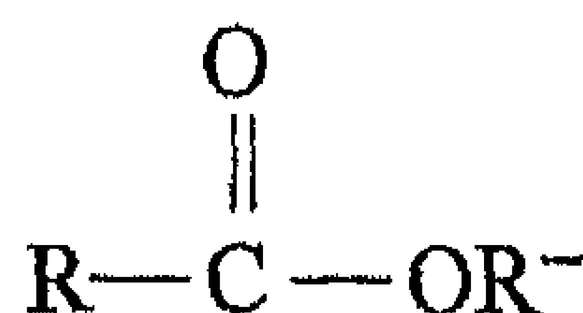


توجد ثلاثيات أسيل الكلسيرول بحالة صلبة أو سائلة إعتماداً على طبيعة الحوامض الدهنية الموجودة فيها. وتمتلك معظم ثلاثيات أسيل الكلسيرول الموجودة في النباتات درجات إنصهار واطئة وتكون سائلة في درجة حرارة الغرفة لاحتوائها على نسبة كبيرة من الحوامض الدهنية غير المشبعة وكمثال حوامض الأوليك واللنوليك واللنولنك. وعلى العكس تكون ثلاثيات أسيل الكلسيرول الموجودة في الحيوانات صلبة أو نصف صلبة ذات درجات إنصهار عالية نسبياً لاحتوائها على نسبة أعلى من الحوامض الدهنية المشبعة وكمثال حامض الستيارك وحامض البالمتك.

4-4 الشموع Waxes:

تنتشر الشموع في الطبيعة بوصفها طبقات واقية للفواكه ولأوراق النباتات كما تفرزها الحشرات كالنحل. وبصورة عامة تكون الشموع مزيجاً من الكانات Alkanes طويلة- السلسلة بعدد فردي لذرات الكربون يتراوح من C_{22} إلى C_{35} ومشتقات أوكسجينية وكمثال كحولات ثانوية وكيتونات. وحيث تكون الشموع عديمة الذوبان في الماء وغير حاوية على أواصر مزدوجة في سلاسلها الهدروكربونية ، نجدها خاملة كيميائياً. فهي تحمي سطوح أوراق النباتات من فقدان الماء والضرر. كما تلعب الشموع دوراً مهماً بوصفها حاجزاً في الحشرات والطيور. (في الريش) والحيوانات كالأغنام.

وهناك شموع تمثل إسترات الحوامض الدهنية طويلة السلسلة والكحولات الأولية طويلة السلسلة:

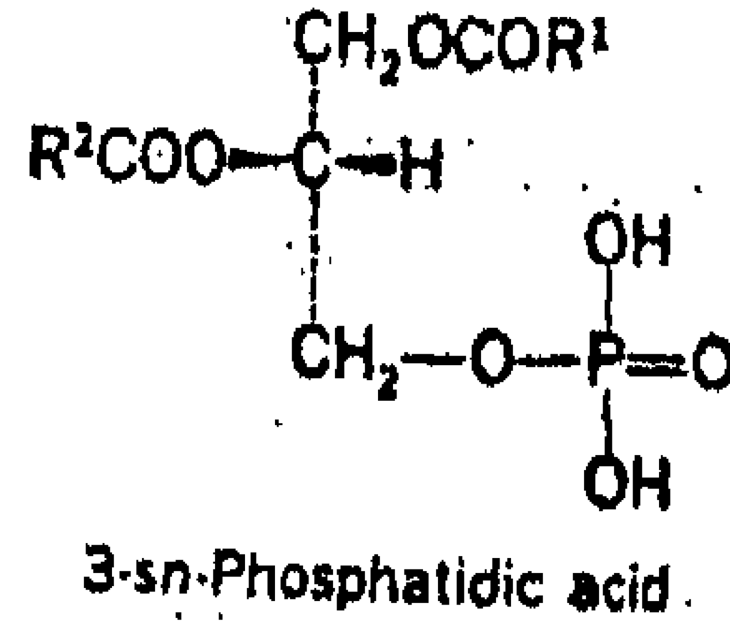


حيث تمتلك 17R-29 ذرة كربون و R- 18-30 ذرة كربون وتكون هذه الاسترات الشمعية ذات أهمية تجارية ملحوظة لأنها تستخدم في تزييت المكائن

Machine lubricants ولقد إستخدم زيت الحيتان sperm whale لسنوات عديدة مصدراً رئيساً لهذه الشموع إلا أنه في السنوات الأخيرة وجد بديلاً قد يصبح مفضلاً وهو نبة تنمو في المناطق الصحراوية وتسمى Jojoba أو Simmondsia حيث تخلق كميات كبيرة من الاسترات الشمعية بمثابة شحوم تخزن في بذورها.

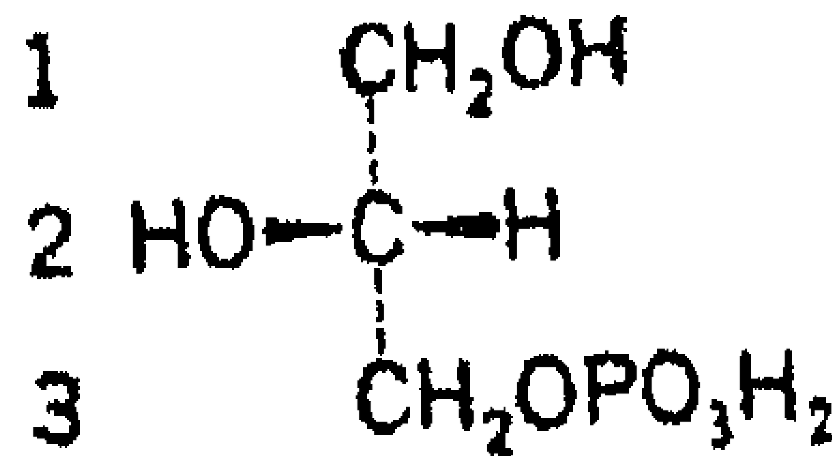
4-5 الشحوم الفسفاتية:

تحتوي هذه الشحوم على مجموعة فسفات إضافة إلى الكلسيرول والحوامض الدهنية وغالباً ما نجد قواعد نتروجينية في تركيبها. وتعد الشحوم الفسفاتية مشتقات لحامض الفسفاتدك:



3-sn-Phosphatidic acid

لاحظ التسمية الحديثة sn-phosphatidic acid-3 للمركب أعلاه الذي يعد مشتقاً للمركب sn-glycerol-3-phosphoric acid والذي كان يسمى سابقاً L-3 Glycerophosphate-.



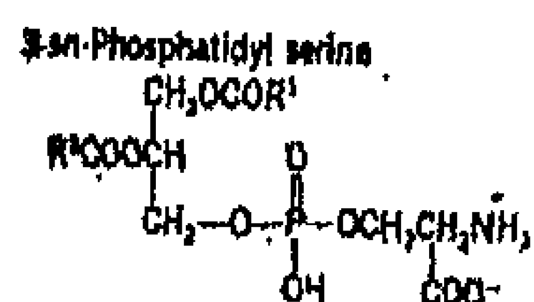
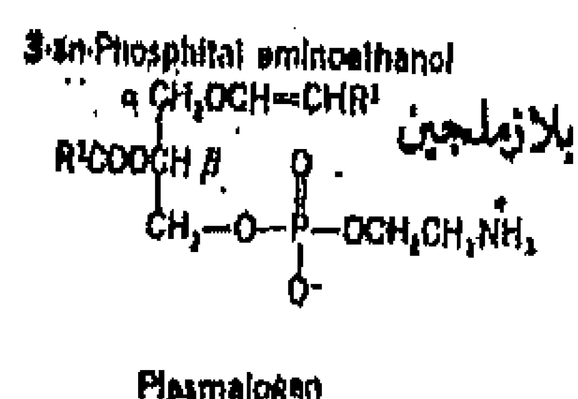
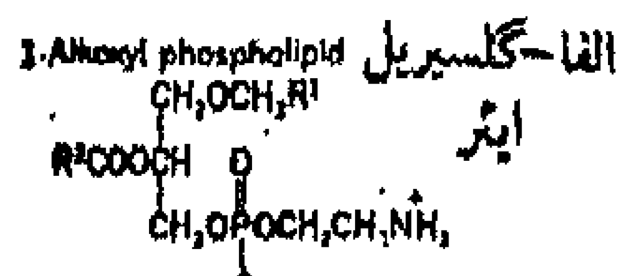
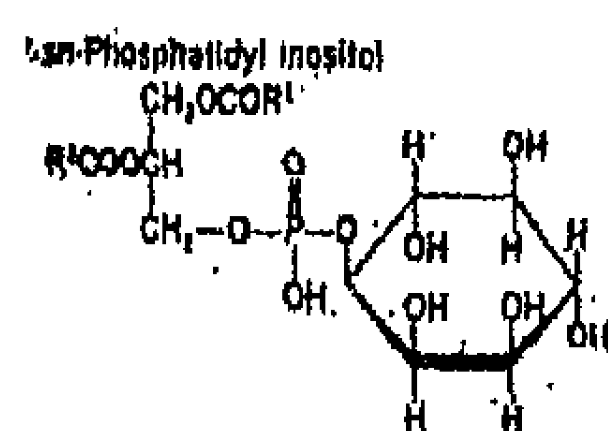
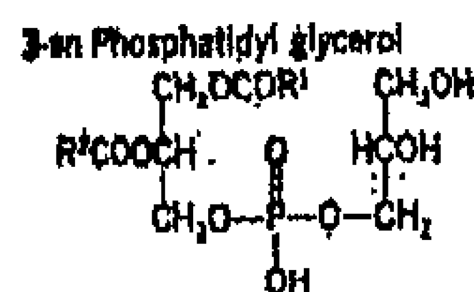
تنتشر الشحوم الفسفاتية في البكتريا والحيوانات والنباتات وتركيبها العام متشابه (جدول 4-2) بغض النظر عن مصدرها. وتقترن الشحوم الفسفاتية: فسفاتديل الايثانولامين وفسفاتديل السيرين وفسفاتديل الكولين بالأغشية الحيوية وتسمى مركبات إمفيباتية لامتلاكها جزءاً قطبياً وآخر غير

قطبي مما يسمح لها بالإقتران بالمحيط القطبي (محب للماء) وغير القطبي (كارة الماء).

جدول 4-2 بعض الشحوم الامفيباتية

القاعدة (الجزء القطبي)	الحامض الدهني (الجزء غير القطبي)	الشحم الصفائحي
كولين Choline	Stearic or palmitic (R[1]) polyunsaturated (R[2]) (R[1]) حامض الستيارك أو البالمتك (R[2]) حامض دهني عديد الآصرة المزدوجة	ليسثين 3-sn-Phosphatidyl choline CH_2OCOR^1 R^2COOCH $CH_2-O-P(=O)(O^-)-OCH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$
امينوايثانول	Stearic or palmitic (R[1]) polyunsaturated (R[2]) (R[1]) حامض الستيارك أو البالمتك (R[2]) حامض عديد الآصرة المزدوجة	سيفالين 3-sn-Phosphatidyl aminoethanol CH_2OCOR^1 R^2COOCH $CH_2-O-P(=O)(O^-)-OCH_2CH_2\overset{+}{N}H_3$ Cephalin

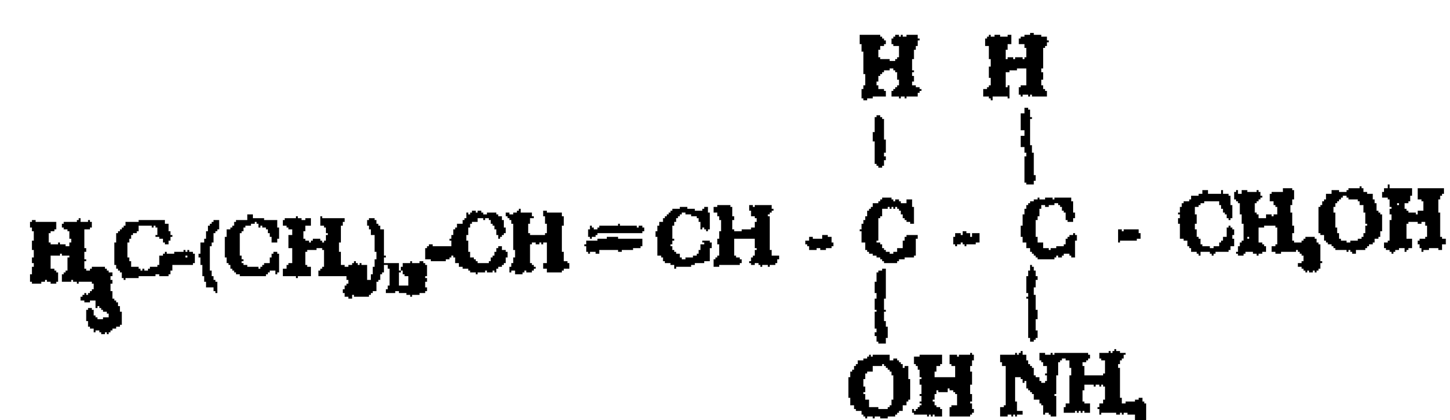
تابع الجدول ٤ – ٢

Serine سيرين	Stearic or palmitic (R1) polyunsaturated (R2) ((R1) حامض استيارك أو بالمتك ((R2)، حامض عديد الآصرة المزدوجة	
Aminoethanol امينوايثانول ،	Unsaturated ether (α) Linoleic (β) ((α)) إيثر غير مشبع ((β)) حامض اللنوليك	
Aminoethanol	R^1 probably an unsaturated fatty acid R^1 قد تكون حامض دهني غير مشبع	
Myoinositol replaces base (مايوانوستول عوضا عن القاعدة	Palmitic (R1) Arachidonic (R2) ((R1) حامض البالمتك ((R2)) حامض الاراكدونك	
Glycerol replaces base الكلسيرول عوضا عن القاعدة	Polyunsaturated fatty acid (R1, R2) حامض دهني عديد الاصرة المزدوجة	

6-4 الشحوم السفنكولية Sphingolipids

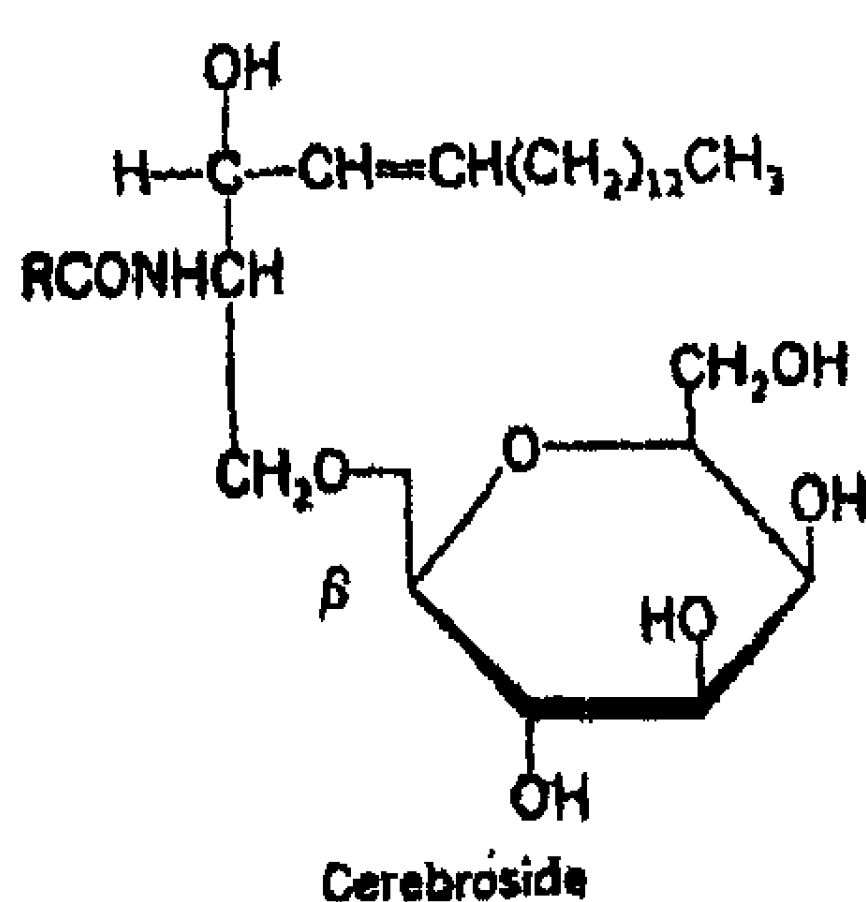
تضم الشحوم السفنكولية مركبات مهمة تقترن بالأغشية الحيوانية وخاصة النسيج العصبي، ويسمى المركب المركزي 4- سفنجنين 4-Sphingenine وكان يدعى سابقاً Sphingenine.

ويتكون سلسلة معقدة من التفاعلات المشتملة على السرين و palmityl-CoA.

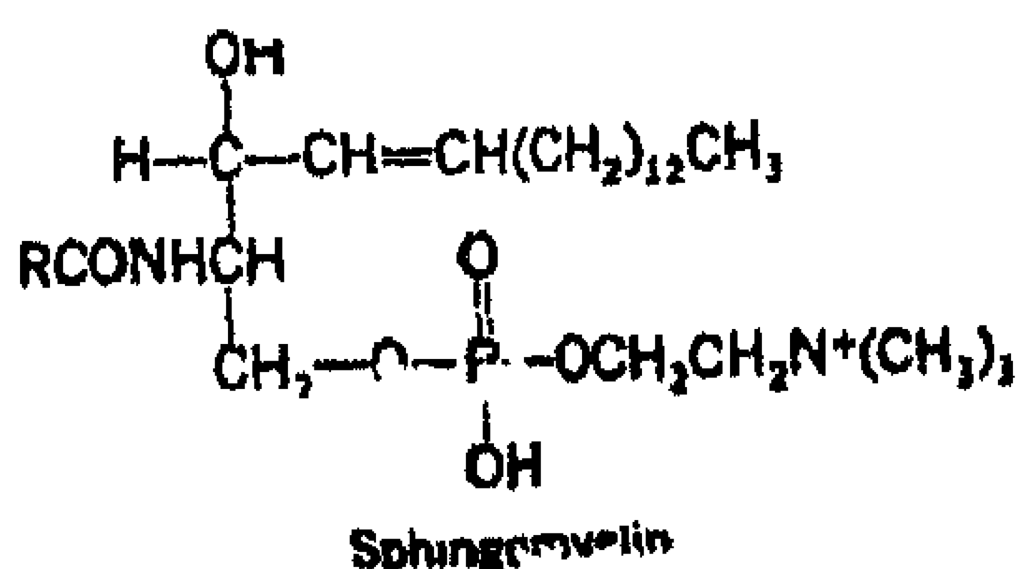


4-Sphingenine

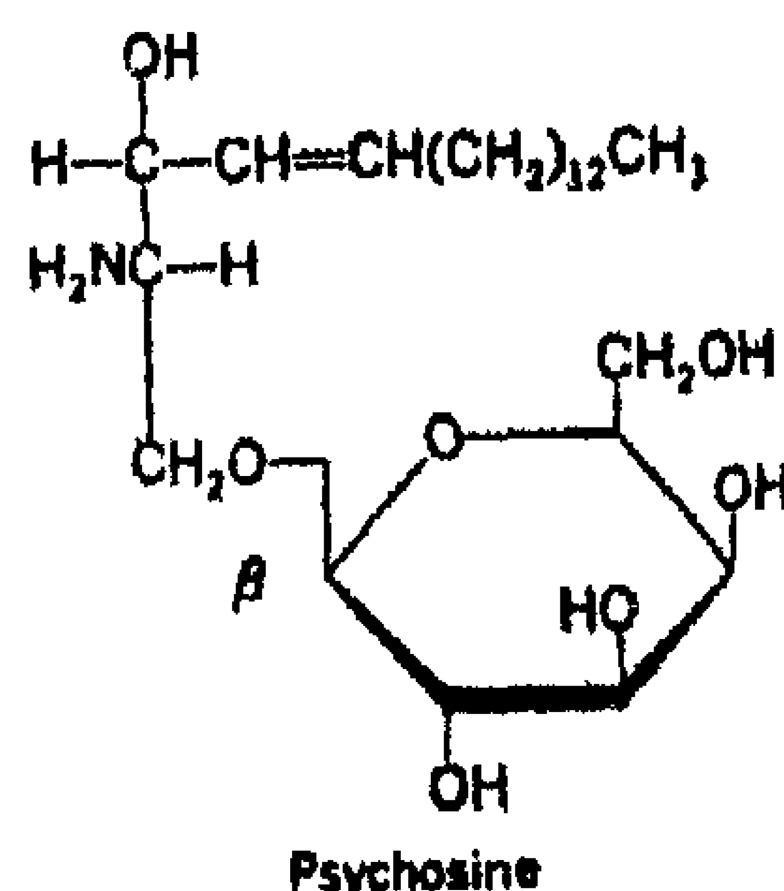
ويمكن لمكونات مختلفة الإرتباط بهذا المركب لإعطاء مشتقات مهمة. وتمثل المركبات أدناه بعض هذه المشتقات.



Cerebroside



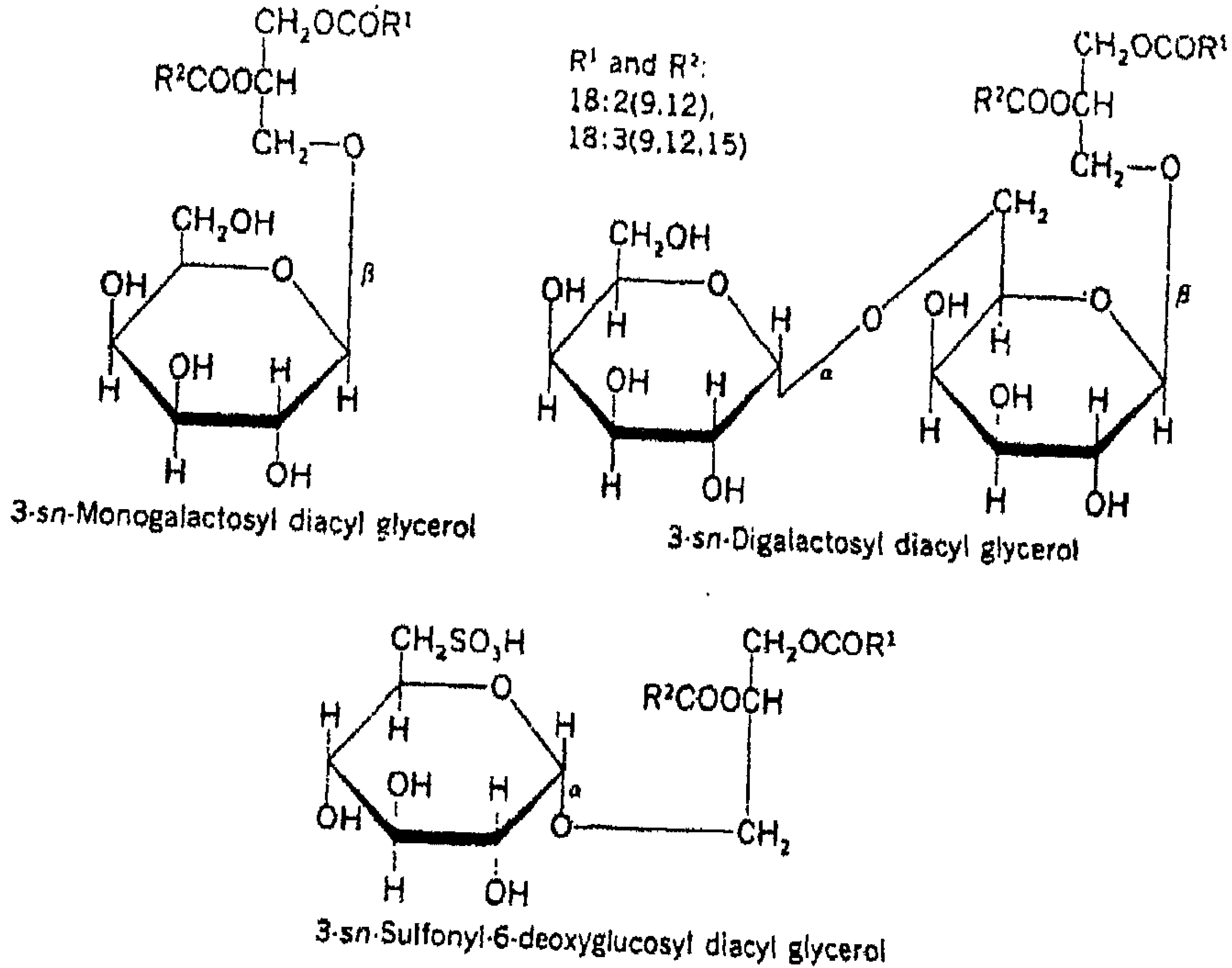
Sphingomyelin



Psychosine

7-4 الشحوم السكرية Glycolipids

وهـي مشتقات كلسيريدية- كربوهيدراتية إمفيباثيـة في طبيعتها وتـضم الـشحوم الكالاكتوزيـة والـشحوم الكبريتيـة الـتي توجـد خاصـة في أغـشية الكوروبلاست وتركيباتها كالآتي:



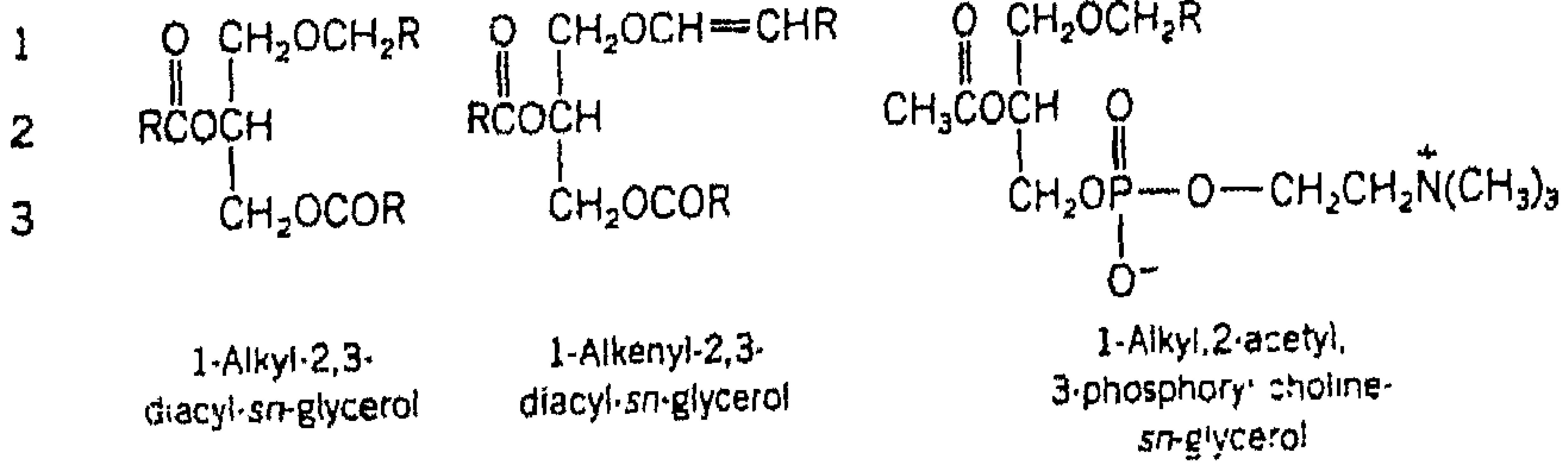
3-sn-Monogalactosyl diacyl glycerol

3-sn-Digalactosyl diacyl glycerol

3-sn-Sulfonyl-6-deoxyglucosyl diacyl glycerol

8-2 إيثرات الكلسيرول

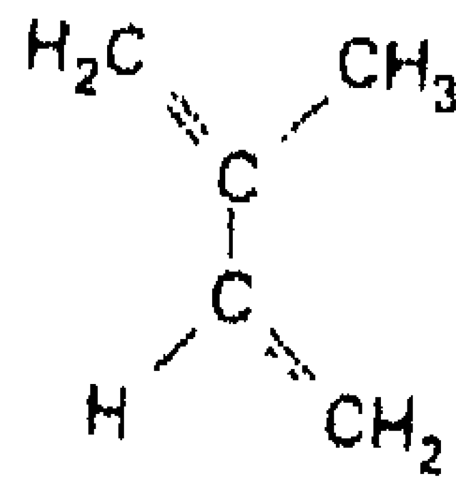
وهي مجموعة مركبات جديرة بالاهتمام نجدها في الكائنات البحرية وفي أنواع آخرى من الحيوانات يمتلك الموقع رقم (1) (c_1 للكلسيرول) إيثراً إلكيلياً مشبعاً أو غير مشبع والموقع رقم (2) ثمالة أسيل فيما يمكن أن يحتوي الموقع رقم (3) على جزء إسيلي أو مجموعة كولين فسفاتية:



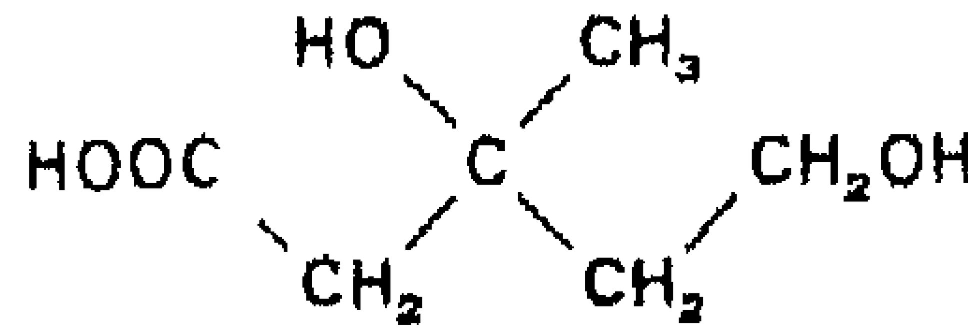
إن وظيفة هذه المركبات غير واضحة حالياً ولقد وجد مؤخراً بأن المركب Alkyl-2-1 choline Acetyl-sn-glycerol-3-phosphoryl يـــؤدي إلى تجمـــع الصفائح الدموية عند وجوده بتركيـز- 10 مولار. ويدل هـذا التركيـز الـواطيء على أن لهذا المركب تاثيرا فيزيولوجياً مهماً.

4-9 التربينويدات والستيرولات Terpenoids and Sterols

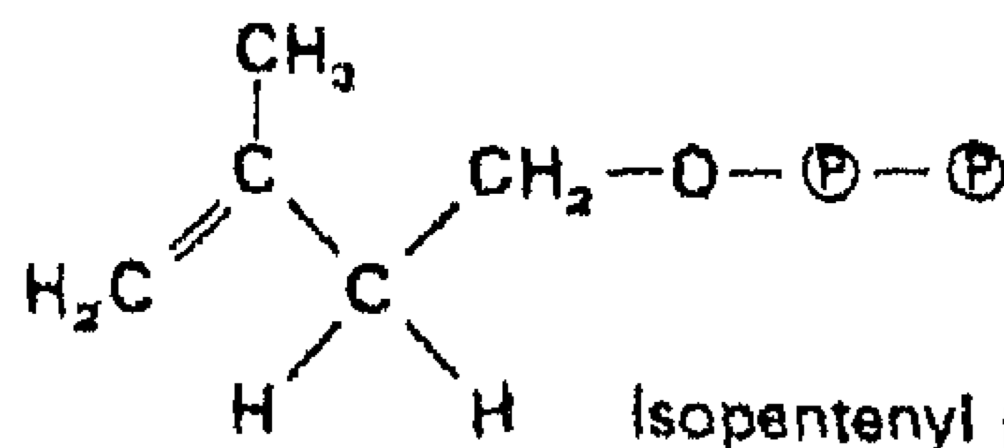
التربينويـدات مجموعـة كـبيرة لمركبـات مهمـة نجـد في تركيبهـا وحـدة متكـررة وهـي وحـدة الايزوبروبينويـد. ونتيجـة لتكـاثف هـذه الوحـدة تتكـون مركبات مثل المطاط والكاروتينويـدات والسترويدات وتربينـات عديدة. لا يوجد الايزوبـروين في الطبيعـة إلا أن المـشتق isopentenyl pyrophosphate يتكـون بسلسلة من التفاعلات الأنزيمية إبتداء من حامض الميفالونك Mevalonic.



"isoprene unit"



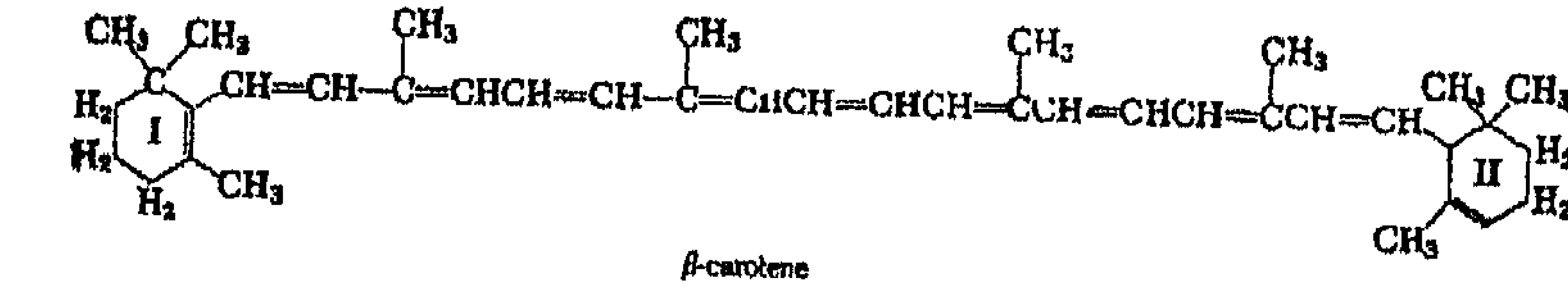
mevalonic acid

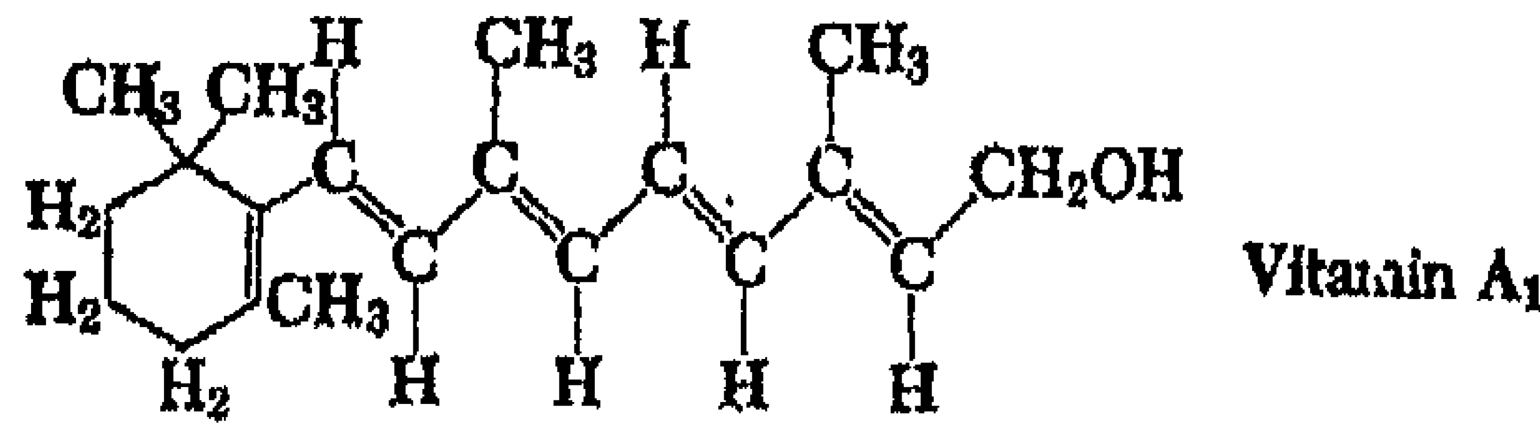


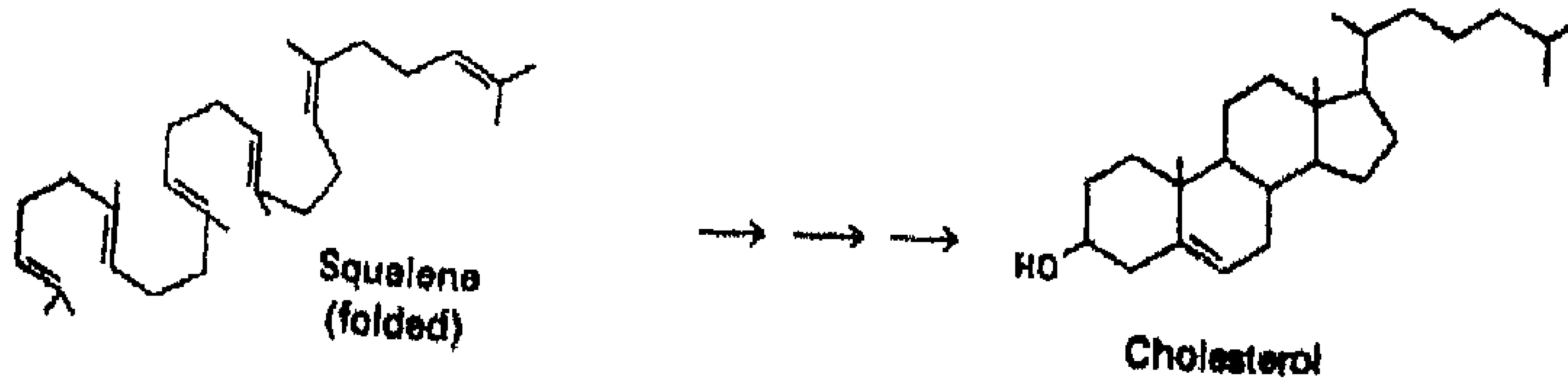
Isopentenyl pyrophosphate (C_5)

ويعاني المركب Isopentenyl pyrophosphate تفاعلات أخرى لتكوين السكوالين الذي يتكاثف مع نفسه لتكوين الكولسترول.

ومن الترپينويدات المركب بيتا- كاروتين B-carotene الذي ينشطر في خلايا الأمعاء المخاطية لتكوين الرتنول Retinol.







10-4 وظائف الشحوم

تلعب الشحوم دوراً مهماً في الوظائف الخلوية. فهي تمثل صيغا للطاقة المخزونة في الخلية كما تلعب دوراً جوهريا في تركيب أغشية الخلايا والعضيات الخلوية ومن الوظائف المهمة للشحوم:

1. مصادر رئيسية للطاقة في الحيوانات والحشرات والطيور والبذور الغنية بالشحوم.

2. منشطات للأنزيمات: تحتاج بعض الأنزيمات الميكروسومية Microsomal وكمثال Glucose-6-phosphatase و desaturase CoA Stearoyl و Monooxygenase وأنزيم المايتوكوندريا D- β - hydroxy-butyric

dehydrongnase إلى مذيلات فسفاتديل الكولين Phosphatidyl choline لتنشيطها.

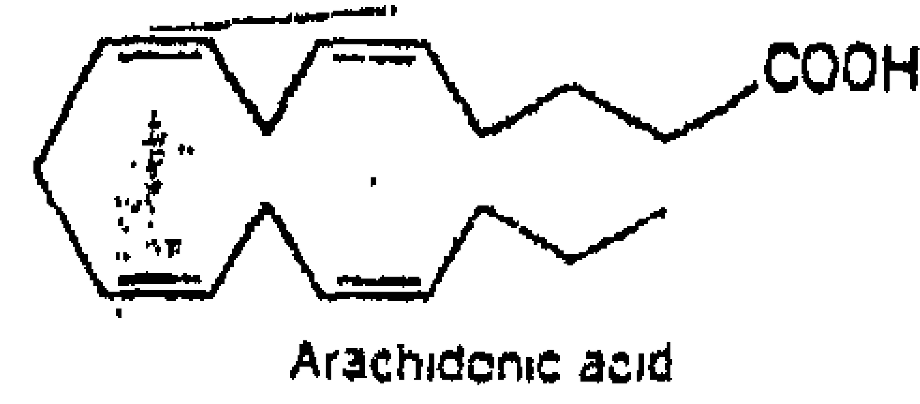
3. مكونات السلسلة التنفسية في غشاء المايتوكوندريا الداخلي:

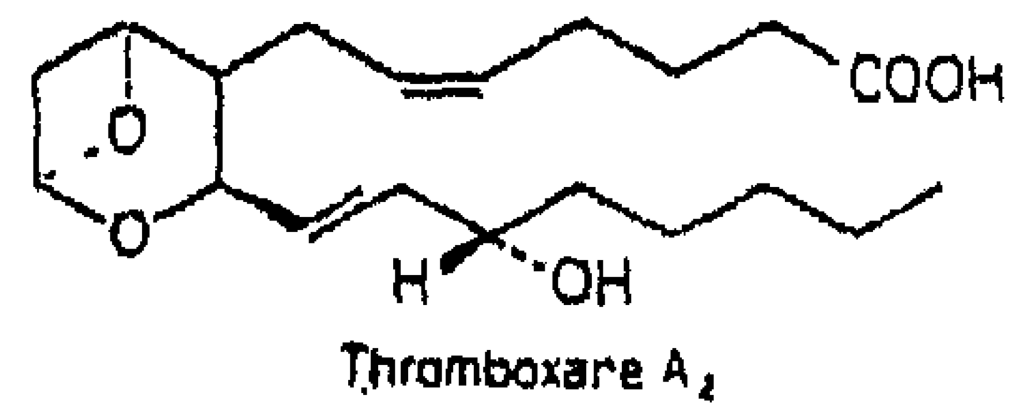
تحتوي السلسلة التنفسية على بعض المكونات الشحمية المطمورة في الشحوم الفسفاتية للغشاء وكمثال اليوبكوينون Co Q. وكذلك الحال في نظام الفسفرة الضوئية الموجود في أغشية الثايلكويد Thylakoid للكلوروبلاستيدات في النباتات الخضراء. وتكون الشحوم الرئيسة في هذه الأغشية كلسيريدات أحادية وثنائية الكالكتوزيل mono-α di- galactosyl diglycerides

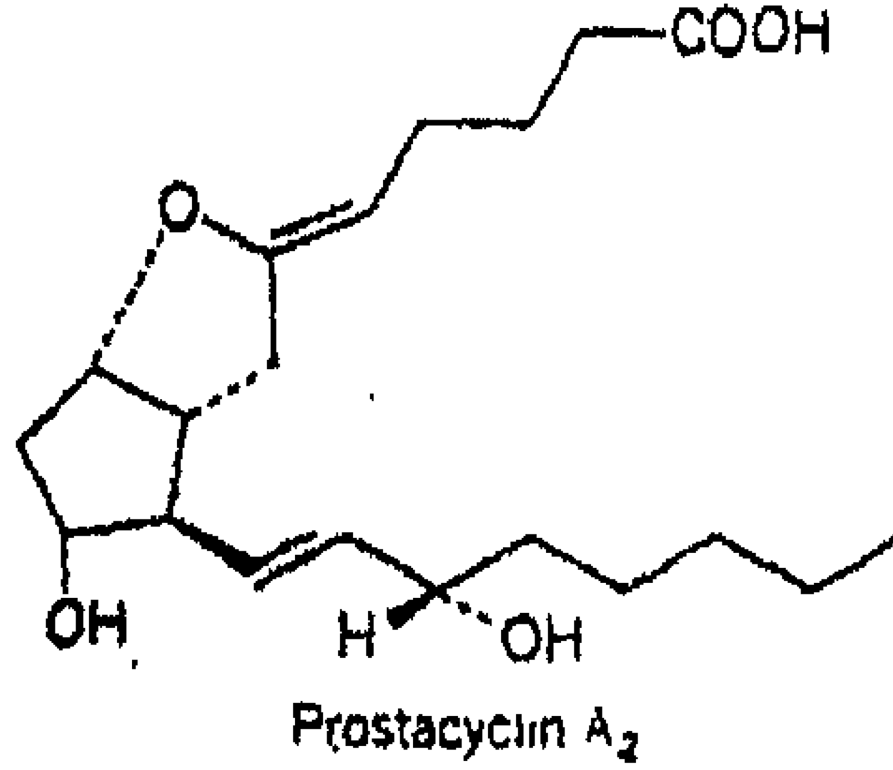
4. يمثل حامض الاراكدونك (5,8,11,14) 20:4 الجزيئة السلف لتخليق البروستكلنديات prostaglandins واللوكوترايئينات Leukotrienes.وتظهر هذه المركبات تأثيرها في خلايا حيوانية معينة بتركيزات واطئة جدا (حوالي 10^{-12} مولار).

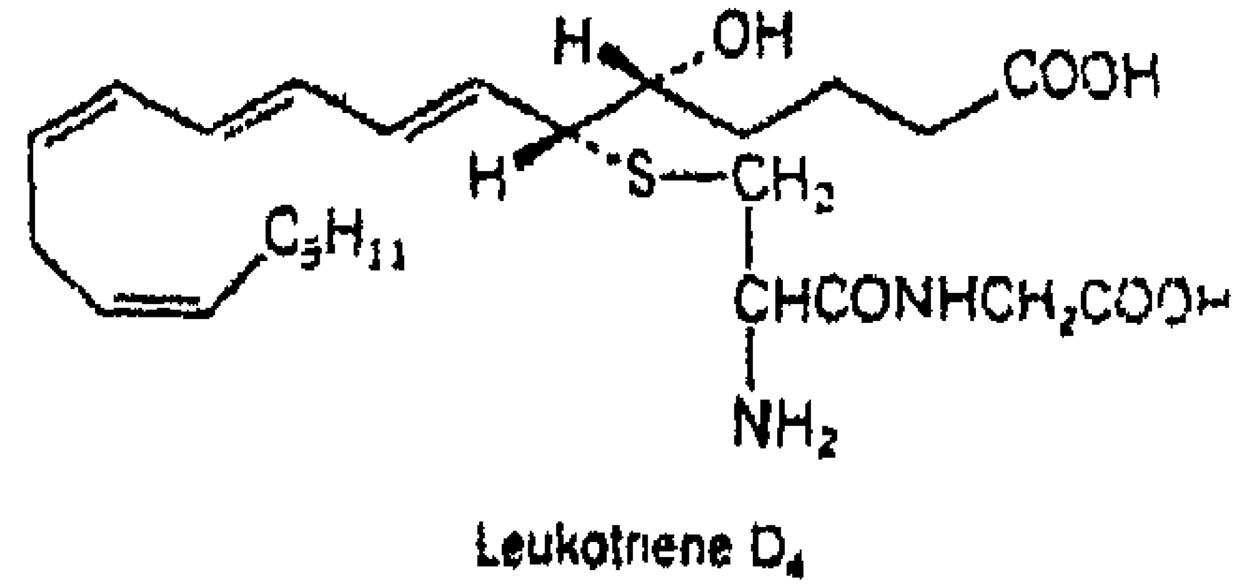
يكون حامض الاراكدونك مرتبطا عادة بجزء الاسيل في الموقع (2) لعدد من الشحوم الفسفاتية وبهذا يكون غير فعال كركيزة. وعند انفصاله بتأثير أنزيم فسفوليباز A_2 (phospholipase A_2) يتحول حامض الاراكدونك الحر بواسطة أنزيم ال Cyclooxygenase وأنزيمات أخرى- إلى مركبات عديدة أهمها مشتقان للبروستكلندين وهما بروستاسايكلين A_2(Prostacyclin)I_2 وثرومبوكسين (Throm- Boxance A_2).

يخلق المركب الأول بصورة رئيسية في جدران الشرايين ويعد-فيزيولوجيا-اكفأ موسع وعائي Vasodialator مكتشف لحد الآن. أما الثرومبوكسين A_2 فيخلق في الصفائح الدموية ويعد أكثر مضيق وعائي Vasocontrictor فعالية معروف لحد الآن. ولقد ثبت مؤخراً بأن اللوكوترايئينات Leukotriense مسؤولة عن تقلص القصيبات الهوائية في حالات الربو Asthma وتركيبات هذه المواد كالآتي:

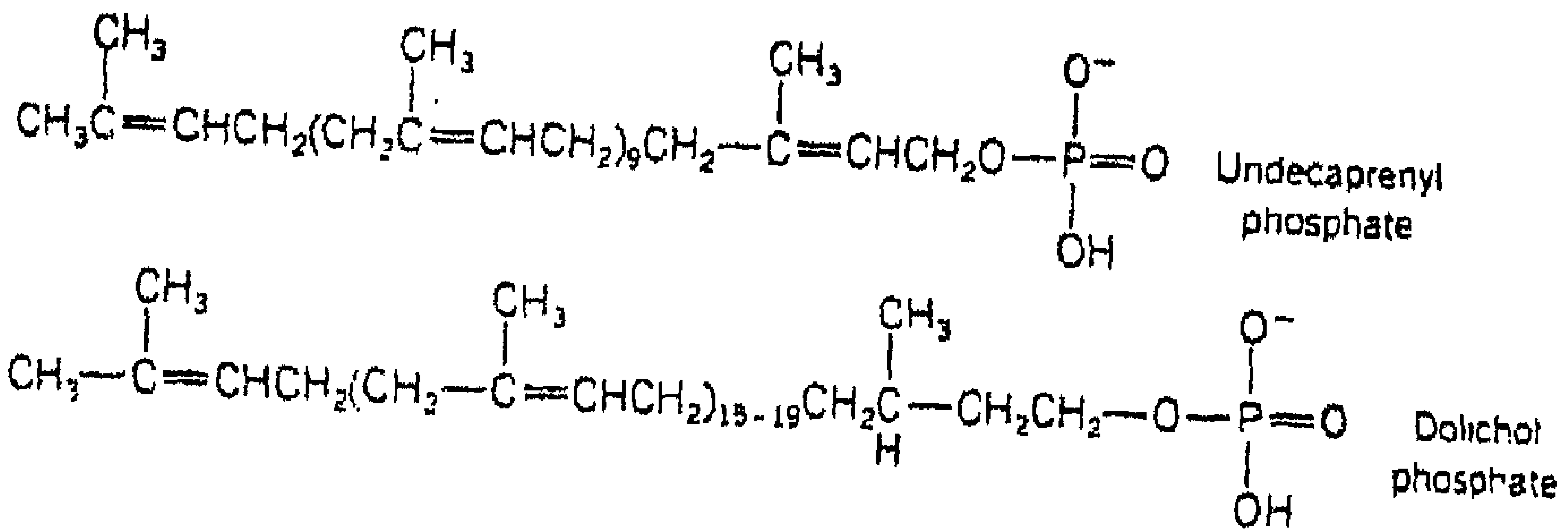








5- حمـل الـكلايكوسـيل Glycosyl carrier يعمـل المركـب الايزوبرينويـدي Undecaprengl phosphate بمثابـة حـامض ليبـوفيلي محـب للـشحوم، Lipophilic لثمالـة الـكليكوسـيل Glycosyl moiety في تخليـق عديـدات الـسـكريد الـشحمية Lipopolysaccharides والـكلايكانـات الببتيديـة peptidoglgcans لجدار خلية البكتريا. وفي خلايا الحيوانات يقوم المركب Dolichol phosphatc بهذه المهمة:

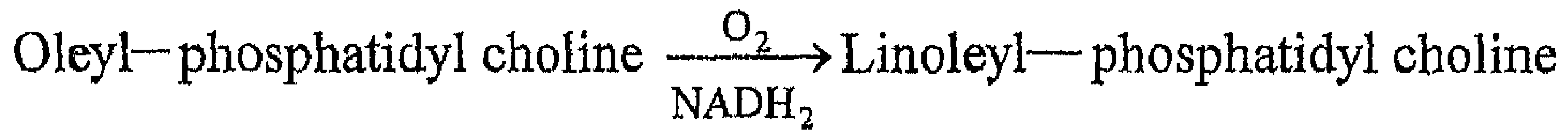


6. يعمل فسفاتديل السرين بمثابة ركيزة عند إزالة الكربوكسيل غير المباشرة للسرين وتحويله إلى الايثانولامين:



Phosphatidylserine → phosphatidyl ethanolamine + CO_2

7. يعمل فسفاتيديل الكولين مع حامض الأوليك في الموقع (2)، بمثابة ركيزة متخصصة للأنزيم A^{12}-Desaturase الموجود في النباتات الذي يحول حامض الأوليك إلى حامض اللنوليك:



$$\text{Oleyl—phosphatidyl choline} \xrightarrow[NADH_2]{O_2} \text{Linoleyl—phosphatidyl choline}$$

8. يعمل فسفاتديل الانوستول ثلاثي الفسفات phosphatidyl- inositol Triphosphate بوصفه جزيئة سلف ذات دور قيادي Key precursor في تكوين مركبات في غشاء بلازما الخلية تقوم بمثابة وسيط "ساعي ثاني"، لإيصال الإشارة الأولية الصادرة عن السيراتونين Seratonin أو الاستيل كولين بأسلوب مشابه لدور المركب CAMP ساعيا ثانيا لإيصال الإشارة الصادرة عن هورمون الكلوكاكون أو الايبنفرين.

4-11 البروتينات الشحمية

لا تنقل الشحوم بصورة حرة في بلازما الدم ولكنها تتحرك بشكل جسيمات تسمى كيلوميكرونات Chylomicrons

أو بشكل بروتينات شحمية قليلة الكثافة، Low-density lipoproteins

LDIP أو معقدات للحوامض الدهنية مع الإلبومين. وإضافة إلى ذلك توجد البروتينات الشحمية في تركيب الأغشية الحيوية.

ويمكن تعريف البروتينات الشحمية بمثاب صنف من الجزيئات الحيوية تكون المكونات الشحمية فيها- ثلاثي اسيل الكلسيرول وشحم فسفاتي وكولستيرول أو استر الكولستيرول- بنسب ثابتة في كل نوع كما في الجدول (4-3). وتحتوي الأجزاء البروتينية بدورها على نسبة عالية لثمالات الحوامض الأمينية غير القطبية التي تسهم في ربط الشحوم. ولقد أبعدت الدراسات في هذه المجال إمكانية ارتباط الشحوم بالبروتينات بأواصر تساهمية أو أيونية. وعلى

العكس من ذلك، تلعب التآثرات الهدروفوبية (كارهة الماء) دورا بارزا في اقتران الشحوم بالبروتينات ويسمى الجزء البروتيني في البروتينات الشحمية باسم Apoprotein.

توجد البروتينات الشحمية كذلك في غشاء المايتوكوندريا والشبكة الهيولية الباطنة Endoplasmic reticulum والنواة. وتحتوي سلسلة نقل الإلكترونات (الموجودة في غشاء المايتوكوندريا الداخلي) على كميات كبيرة من البروتينات الشحمية. كما توجد أنظمة البروتينات الشحمية الصفاحية Lamellar في ميلين الغمد Mylein sheath للأعصاب وفي تركيبات المستلمات الضوئية Photoreceptive وفي الكلوروبلاست وأغشية البكتريا.

4-12 مقارنة لتوزيع الشحوم في الكائنات الحية

يختلف توزيع الشحوم بصورة عامة في الخلايا بدائية النواة procaryotic عنه في الخلايا حقيقية النواة Eucaryotic.

جدول 4-3: تركيب بعض البروتينات الشحمية

المصدر	البروتين الشحمي	الوزن الجزيئي	البروتين	الشحم الفسفاتي	الكولسترول (حر+ استر)	ثلاثي أسيل الكلسيرول
مصل الدم	كيلوميكرون ذو كثافة واطئة جدا VLDIP	10-10	2	6-3	5-2	95-80
		10×100^{-5}	10-5	20-15	25-10	65-40
	ذو كثافة واطئة LDLP	10×2	25	20	45	10
	ذو كثافة عالية HDLP	10×0.25	50-40	30	20	5-1
صفار البيض (الحليب)	B-Lipovite llin ذو كثافة واطئة	10×4	78	12	1	9
		10×4	13	52	صفر	35

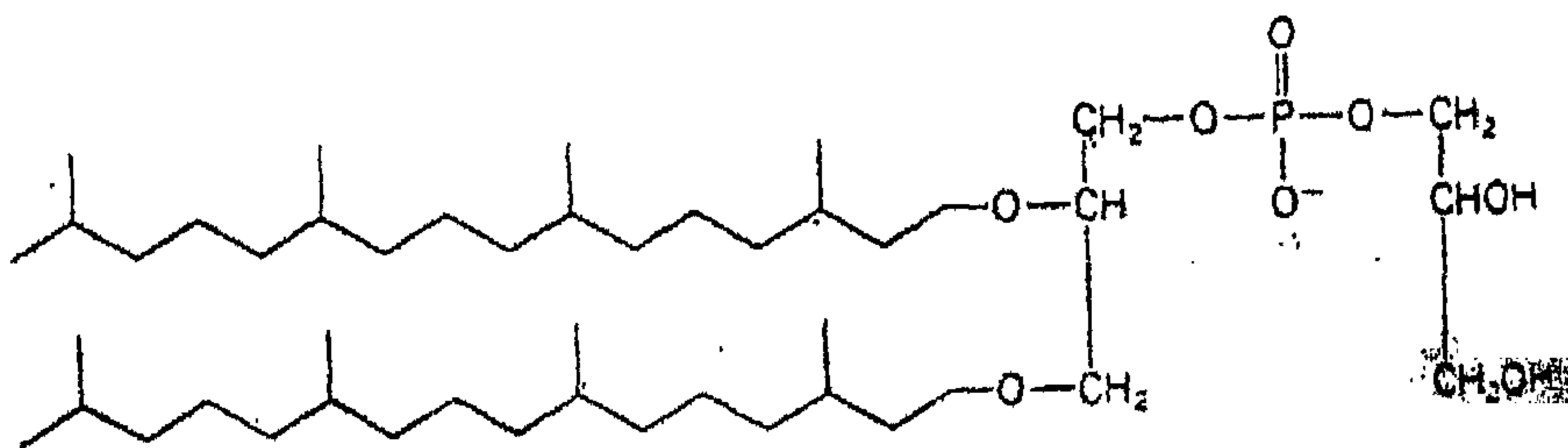
4-12-1 الخلايا بدائية النواة Procaryotic cells

يوجد في خلية البكتريا ما يزيد على 95٪ من الشحوم جزءا من غشاء الخلية وتتوزع الباقي (5٪) بين السايتوبلازم وجدار الخلية وتتميز خلايا البكتريا بعدم وجود الستيرولات في خلاياها. لا تتمكن هذه الخلايا من تخليق الحلقة السترويدية على الرغم من قدرتها على تكوين بوليمرات ايزوبنويدية مستقمية.

كما لا تحتوي البكتريا عدا المتفطرة Mycobacteria على ثلاثيات اسيل الكلسيرول. لا تستيطع البكتريا كذلك تخليق الحوامض الدهنية عديدة الأواصر المزدوجة غير المتبادلة والمعروفة (جدول 4-1) عدا عن العصيات Bacilli التي تستطيع تخليق (7.10) 16:2 وبهذا فأن البكرتيا تستطيع تخليق الحوامض الدهنية المشبعة وأحادية الآصرة المزدوجة والبروبان الحلقي ومتشعبة السلسلة. وفي الواقع نجد أن بعض أنواع البكتريا مثل المفطورة Mycoplasma وبعض طوافر Mutants البكتريا E.Coli قد فقدت قدرتها على تخليق الحوامض الدهنية أحادية الآصرة المزدوجة وتحتاج إلى وجودها في الوسط الزرعي.

ومن الجدير بالذكر، عدم وجود الحوامض الدهنية في الكائنات بدائية النواة المسماة Archaebacteria وتضم هذه الكائنات البكتريا المنتجة للميثان في الظروف اللاهوائية والبكتريا القادرة على العيش في درجات حرارة عالية Thermophilic bacteria والبكتريا القادرة على المعيشة في البحيرات ذات الملوحة العالية Halophilic bacteria ونجد في غشاء الخلية لهذه الكائنات ايثرات الكلسيرول عوضاً عن الشحوم الفسفاتية مشتق تربينويدي Terpenoid (وهو شالة الفايتيل Phytanyl عوضاً عن مشتق الحامض الدهني وكمثال:


2.3- diphytanyl-Sn-glycerol- phosphoryl-1-Sn-glycerol



ولا يعرف حاليا الأهمية التطورية لوجود هذه الشحوم المتميزة في هذه الكائنات البدائية.

2-12-4 الخلايا حقيقية النواة Eucaryotic cells

النباتات:

تحتوي بذور النباتات الزهرية- بصورة عامة- تكوينا ثابتا من الحوامض الدهنية تمثل تعبيرا للنمط الظاهري phenotypic لنوعها الجيني Genotype، وتوجد الحوامض الدهنية غير الشائعة جزءا من تركيب ثلاثيات اسيل الكلسيرول وفي البذور الناضجة ولا توجد في العضيات مثل المايتوكوندريا والكلوروبلاست.

وتمتلك الكلوروبلاستدات الموجودة في النباتات الزهرية نمطا ثابتا من الحوامض الدهنية والشحوم المعقدة. ونجد بصورة خاصة الحامض الدهني عديد الآصرة المزدوجة الفا- لنولنك مقترنا بشحوم أربعة معقدة وشديدة القطبية تتميز بها الأنسجة القادرة على التركيب الضوئي وهي:

أ- Monogalactosyl diacyl glycerol

ب- Digalactosyl-diacyl glycerol

جـ- Sulfo quinovosyl-diacyl glycerol

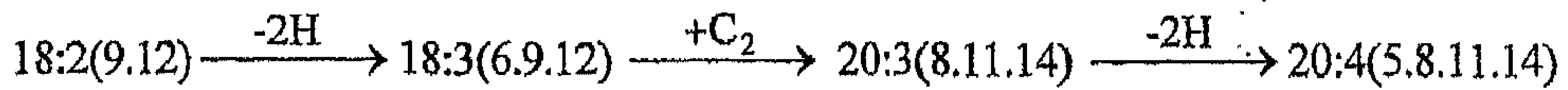
د- phosphatidyl glycerol

تقترن هذه الشحوم بصورة وثيقة بالأغشية الصفاحية للكلوروبلاستيدات. وتخلق النباتات الزهرية مدى واسعا من الحوامض الدهنية عديدة الآصرة المزدوجة وأهمها في تغذية الإنسان- حامض اللنوليك [(9.12) 18:2]

الحيوانات:

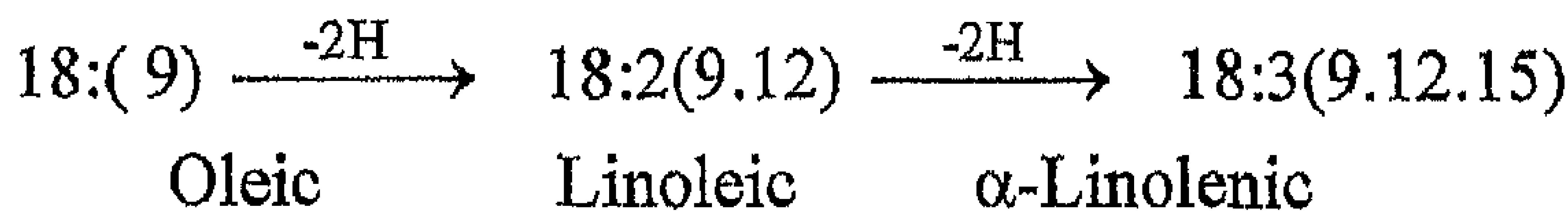
لا تقل شحوم الخلايا الحيوانية تعقيدا عن شحوم الخلايا النباتية. كما أن تكوينها مميز لنوع الخلية. فمثلا تكون الخلية العصبية غنية بالشحوم السفنكولية وايثرات الكلسيرول والبلازملوجينات plasmalogens والشحوم الفسفاتية. أما الخلية الدهنية Adipose cell فتتكون بصورة أساسية من قطيرات لثلاثي اسيل الكلسيرول. وهناك ميزة بارزة لخلايا المملكة الحيوانية وهي عدم قدرتها على تخليق حامض اللنوليك. وبصورة عامة تستطيع الخلايا حقيقية النواة (النباتية والحيوانية) تخليق Oleyl CoA من المركب Stearoyl CoA بالية هوائية Aerobic mechanism يتم بها ادخال آصرة مزدوجة من نوع المقرون في الموقع 10، 9 (Cis-9.15) إلا أن الحيوانات لا تمتلك الأنزيمات القادرة على إدخال آصرة مزدوجة أخرى في حامض الأوليك لتكوين حامض اللنوليك على الرغم من انتشار أنزيم Desatvrase لهذا الغرض في المملكة النباتية. إضافة إلى ذلك تستطيع الخلايا الحيوانية إدخال اواصر مزدوجة من نوع المقرون Cis في السلسلة الهدروكربونية باتجاه النهاية الكربوكسيلية فقط بينما تستطيع الخلايا النباتية إدخال اواصر مزدوجة باتجاه الطرف المثيلي:

أ. في الخلايا الحيوانية:



linoleic γ- linolenic Home-γ- linolenic Arachidonic

ب- في الخلايا النباتية:

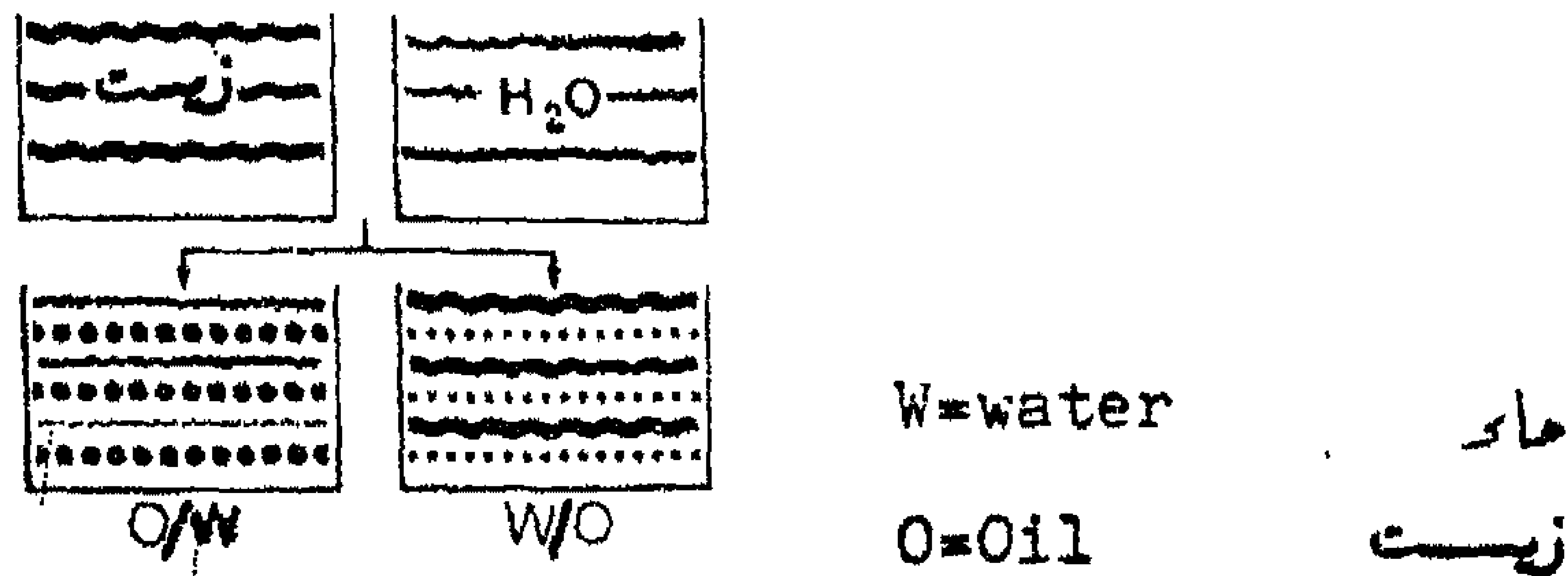


13-4 العوامل النشطة في السطوح (عوامل الإستحلاب) Surface Active Agents

تلعب بعض المواد الطبيعية والصنعية دوراً مهما في الطبيعة والصناعة حيث تعمل على خفض شدة توتر السطح البيني Interface بين طورين غير قابلين للامتزاج مؤدية إلى تكوين مستحلب مستقر وتسمى هذه المواد عوامل نشطة في السطوح. وقبل الدخول في تفصيلات هذه المركبات لا بد من شرح موجز للمستحلب.

يتكون المستحلب عند رجّ سائلين غير قابلين للذويان رجّاً قوياً وكمثال الزيت والماء، حيث تنتشر قطرات أحد السائلين في السائل الآخر.

فأذا نتج المستحلب عن انتشار قطرات الماء في الزيت سمي مستحلب الماء في الزيت ويرمز له ماء/ زيت. ويكون الزيت الطور الخارجي للمستحلب. أما إذا تكون المستحلب نتيجة لإنتشار قطرات الزيت في الماء سمي متسحلب الزيت في الماء ويرمز له زيت/ماء ويكون الطور الخارجي ماء كما في الشكل (4-1) أدناه.



شكل (4-1) مستحلب (أ) ماء/ زيت و (ب) زيت/ ماء.

ويكون المستحلب مستقرا عندما تكون شدة توتر السطح البيني بين السائلين منخفضة وبالعكس ينفصل السائلان بعضهما عن بعض إذا كانت شدة توتر السطح البيني عالية وهنا يكمن دور المواد الفعالة في السطوح حيث تخفض

شدة توتر السطح البيني وتؤدي إلى تثبيت قطرات احد السائلين في الثاني ولهذا تسمى عوامل الإستحلاب.

ويمكن تقسيم العوامل النشطة في السطوح والمتسخدمة في الأغذية إلى قسمين:

1. العوامل الطبيعية

أ. العوامل الأيونية: كالبروتينات والشحوم الفسفاتية مثل اللسثين Lecithin.

ب. المركبات المتعادلة: وكمثال الشحوم الكربوهيدراتية Glycolipids والسابونينات Saponins.

2. العوامل الصنعية synthetic

أ. المركبات الأيونية: وكمثال Stearyl-2 Lactylate

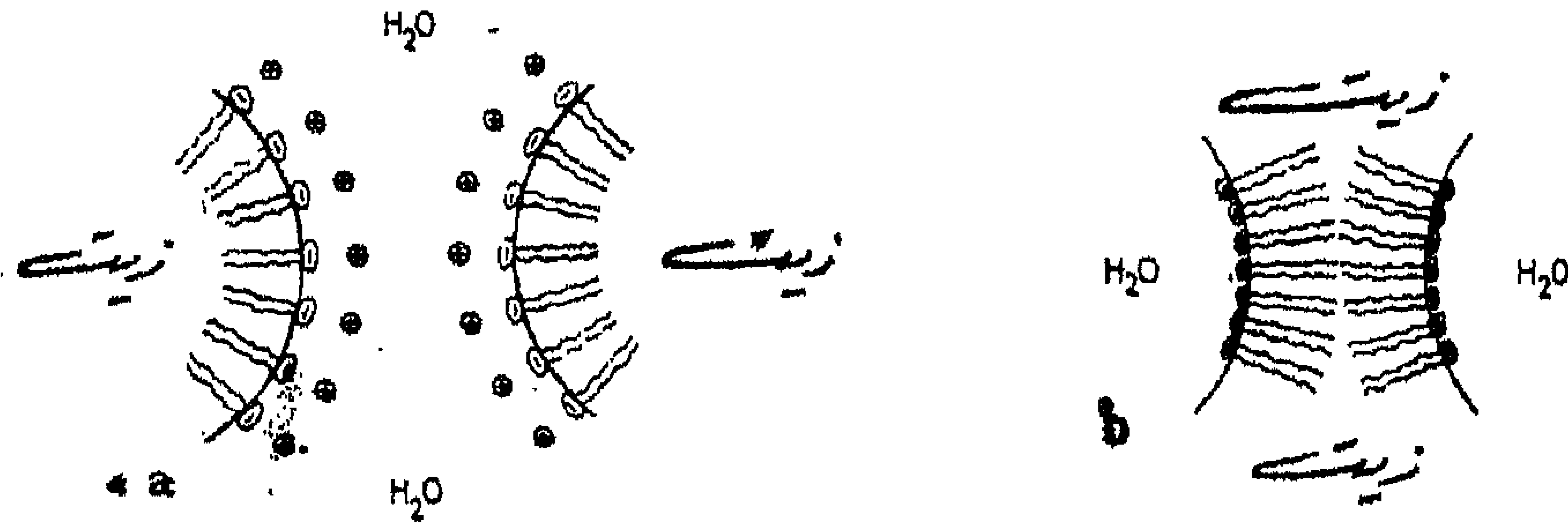
ب. المركبات المتعادلة: احاديات وثنائيات الكلسيريدات واستراتها المتكونة مع حامض الخليك أو السترك أو التارتارك أو اللاكتات، وكذلك استرات الحوامض الدهنية للسكروز أو للسوربيتول Sorbitol.

4-13-1 آلية عمل المواد النشطة في السطوح (عوامل الاستحلاب)

تمتلك عوامل الاستحلاب في تركيبها جزءا محبا للماء Hydrophilic وآخر كارها له Hydrophobic ومحبا للزيت وتسمى جزيئات من هذا النوع جزيئات امفيباثية Amphipathic لوجود الجزئين: القطبي محب الماء وغير القطبي أو الهدروفوبي كاره الماء. يتكون الجزء القطبي عادة من مجموعة متأينة أو مجاميع هدروكسيلية أو ايثر متعدد الكلايكول polyglycolether بينما يتكون الجزء غير القطبي عادة من سلسلة الكيلية Alkyl Chain.

تعمل عوامل الاستحلاب الايونية عادة على تثبيت مستحلب الزيت في الماء حيث يذوب جزء الالكيل لعامل الإستحلاب في الطور البيني وباتجاه قطرات

الزيت في الوقت الذي تتجه المجاميع المشحونة نحو جزيئات الماء مؤدية إلى استقطابها وتكوين طبقة مها مشحونة بالشحنات المخالفة كما في الشكل (4-2-أ).



شكل (4-2) آلية عمل المستحلبات (أ) الأيونية (ب) المتعادلة.

أما عوامل الاستحلاب المتعادلة فترتب جزيئاتها على سطح قطرات الزيت بحيث يكون الجزء القطبي منها باتجاه الطور المائي (شكل 4-2-ب).

4-13-2 نسبة الخاصية المحبة للماء إلى الخاصية الكارهة له لعوامل الإستحلاب

Hydrophilic-lipophilic balance, HLB

تكون عوامل الاستحلاب أكثر ذوباناً في الزيوت عندما تكون مجموعاتها الكارهة للماء أقوى من مجموعاتها المحبة للماء. وبالتالي تحبذ هذه المواد تثبيت مستحلب الماء في الزيت والعكس صحيح أيضاً. أي أن عوامل الإستحلاب التي تكون مجموعتها الكارهة للماء أضعف من مجموعتها المحبة للماء أكثر ملاءمة لتثبيت مستحلب الزيت في الماء (زيت/ماء). يتضح مما تقدم بأن ملاءمة عامل الإستحلاب لتحضير مستحلب معين يحددها نوع وعدد المجموعات المحبة والكارهة للماء في جزيئة عامل الإستحلاب.

وتمثل القيمة HLB نسبة قوة المجموعات المحبة للماء إلى المجوعات الكارهة له في عوامل الإستحلاب وتكون هذه القيمة واطئة لعوامل الإستحلاب

الكارهة للماء (أي التي تغلب فيها الخاصة الكارهة للماء) وتزداد بازدياد قوة الجزء المحب للماء في الجزيئة فمثلا تكون القيمة HLB لحامض الأوليك (1) والملحه Na-oleate تصبح (18).

واستناداً لما تقدم تمتلك عوامل الإستحلاب المستخدمة لمستحلبات الماء في الزيت (ماء/زيت) قيمة HLB واطئة بينما تستخدم عوامل الإستحلاب ذات قيمة HLB عالية لتثبيت مستحليات الزيت في الماء (زيت/ماء) ويوضح الجدول 4-4 قيم HLB لبعض عوامل الإستحلاب.

جدول 4-4: قيم HLB (نسبة الخاصية المحبة للماء إلى الخاصية الكارهة له) لعوامل الإستحلاب (المواد الفعالية في السطوح).

قيمة HLB	عامل الإستحلاب
1	Oletic acid
2.1	Sorbitan tristearate
3.4	Stearyl monoglyceride
4.7	Sorbitan monostearate
8.6	Sorbitan monostearate
9.8	Gelatin
10.5	Polyoxyethylene-Sorbitan tristearate
10.5	Methyl cellulose
14.9	Polyoxyethylene-Sorbitan monostearate
15	Polyoxyethylene-Sorbitan monooleate
18	Sodium oleate
20	Potassium oleate

4-13- 3 وصف عوامل الاستحلاب

أ. فسفاتيدات phosphatides

تستخدم فسفاتيدات الامونيوم بوصفها مواد استحلاب في الأغذية. وهي استرات للحوامض الدهنية وحامض الفسفوريك مع الكلسيرول وتكون ثمالة

حامض الفسفوريك بشكل أملاح الامونيوم. ويمكن لهذه المركبات أن تكون كلسريدات أحادية أو ثنائية.

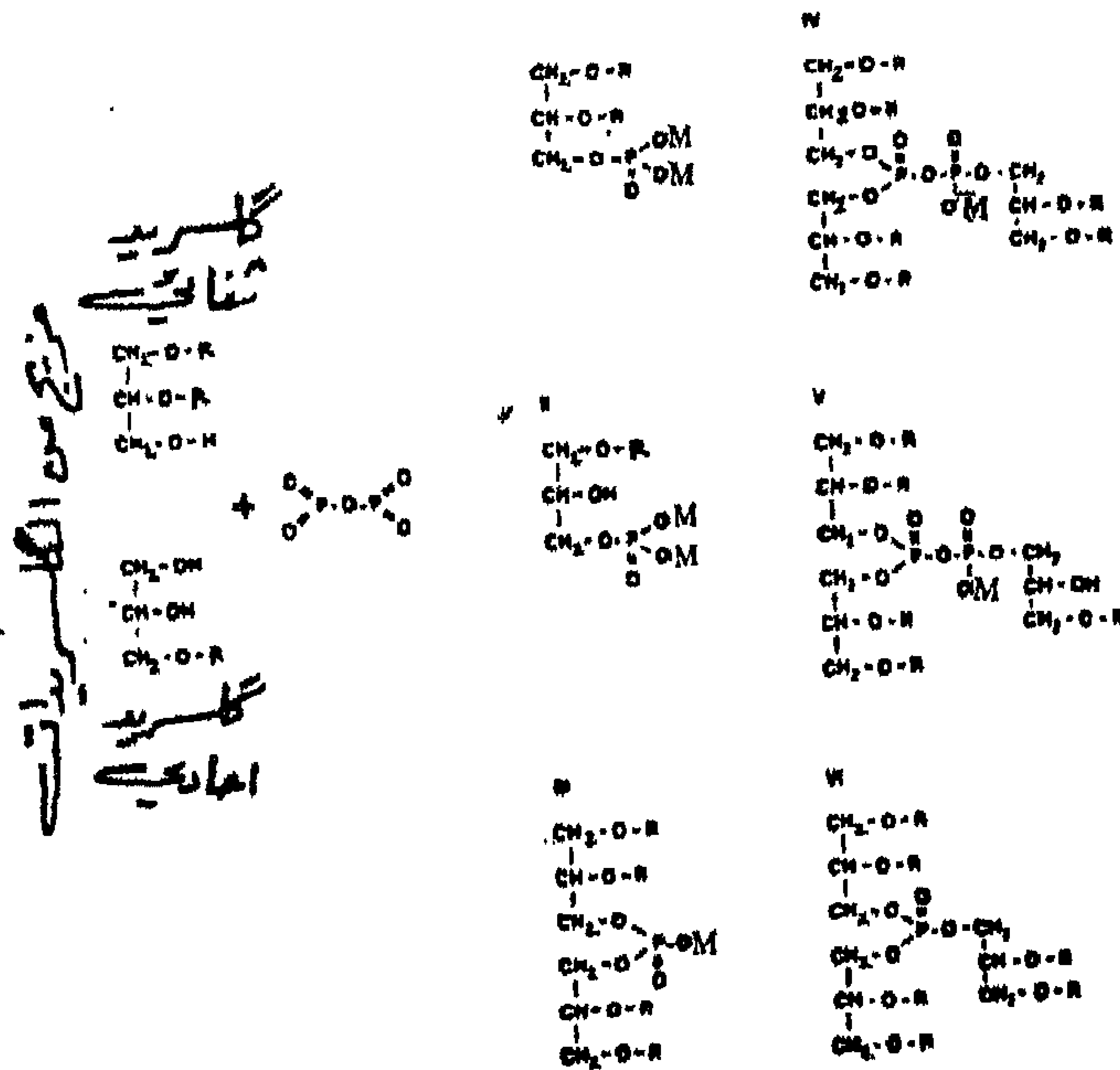
تحضير فسفاتيدات الامونيوم

هناك ثلاث خطوات في تحضير هذه المركبات:

الخطوة الأولى: تحضير مزيج من الكلسريدات، ويتم اختيار ظروف التفاعل بحيث تكون نسبة إنتاج الكلسريد اعلى ما يمكن.

الخطوة الثانية: يتم التفاعل في ظروف محددة بين مزيج الكلسريدات المحضر في **الخطوة الأولى** وخامس اوكسيد الفسفور phosphorus pentoxide P_2O_5

الخطوة الثالثة: يعادل المزيج الناتج عن **الخطوة الثانية** باستخدام غازالامونيا ويتكون نتجه لذلك عدة مركبات وأهمها المركبات الست المبينة في أدناه:



إذ تمثل R ثمالة الحامض الدهني H=M أو NH_4^+ أما تسمية المركبات المرقمة I إلى VI فكما يأتي:

I: حامض الفسفاتدك أو Ammonium Phosphatide

أو Mono- diglyceridyl phosphate

أو Mono-diglyceridyl ammonium phosphate

II: Lysophosphatidic acid   Mono-monoglyceride phosphate

أو Mono-monoglyceridyl ammonium phosphate

III: Bis- phosphatidic acid أو

Bis- diglyceridyl ammonium phosphat

IV: Bis- phosphatidyl monophosphatidic acid

أو Tris- diglyceridyl pyrophosphate

أو Tris- diglyceridyl ammonium pyrophosphate

V Bis- phosphatidyl-Lyso- phosphatidic acid

أو Bis- diglyceridyl - mono - monoglyceridyl ammonium pyrophosphate

VI Tris- phosphatidic acid أو Tris- diglyceridyl phosphatidic acid أو Bis- diglyceridyl phosphatide

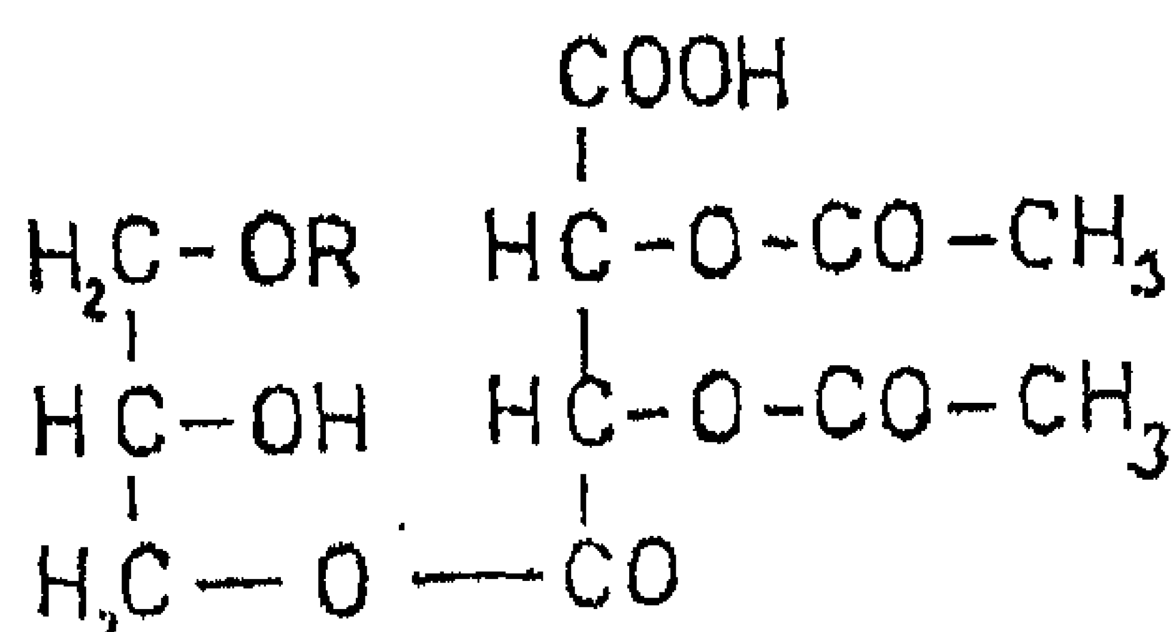
ب. اللسثين Lecithin

تعد مجموعات اللسثين من مواد الاستحلاب المهمة جداً في تصنيع الأغذية. ويستخدم اللسثين الخام عادة في الأغذية حيث يستخلص بصورة رئيسية من فول الصويا ومن صفار البيض وينتج اللسثين بصيغتين ذائبة وغير ذائبة في الإيثانول، ويستخدم اللسثين الذائب في الإيثانول لتثبيت مستحلب زيت/ماء ويتميز بقيمة HIB عالية تبلغ 14-15 بينما يستخدم اللسثين غير الذائب في الإيثانول لتثبيت مستحلب ماء/زيت.

جـ. أحاديات الكلسريد

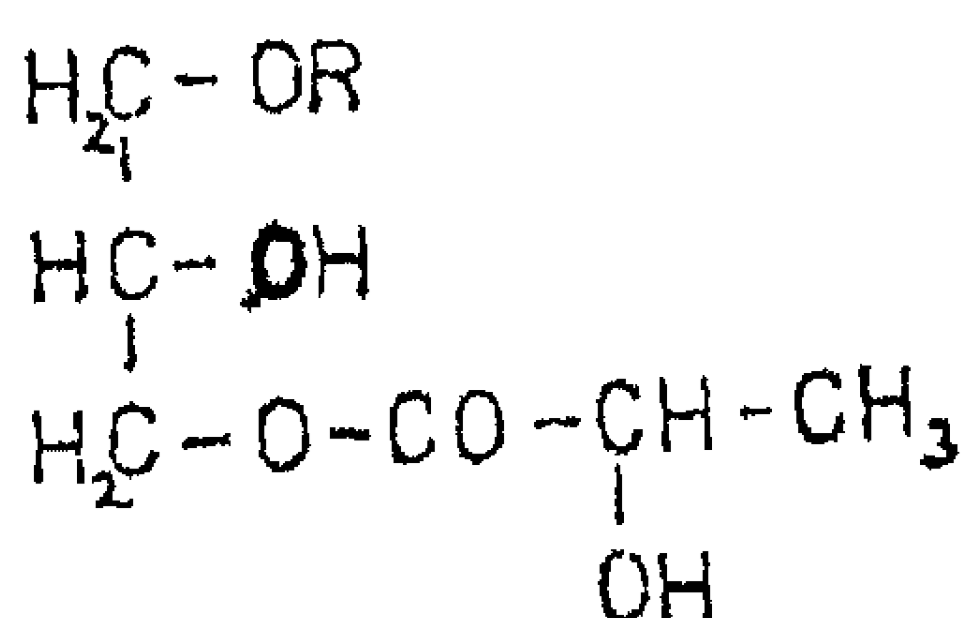
تعد أحاديات الكلسريد من مواد الإستحلاب الطبيعية ذات قيمة HLB واطئة فهي مثلاً 3.8 للمركب Monostearoyl glycerol بينما لا تمتلك ثنائيات الكلسريد صفة عوامل استحلاب ويمكن زيادة الخاصية المحبة للماء لأحاديات الكلسريد من خلال استرتها مع مجموعات محبة للماء وكمثال المركب:

Diacetyl tartaric acid monoglyceride

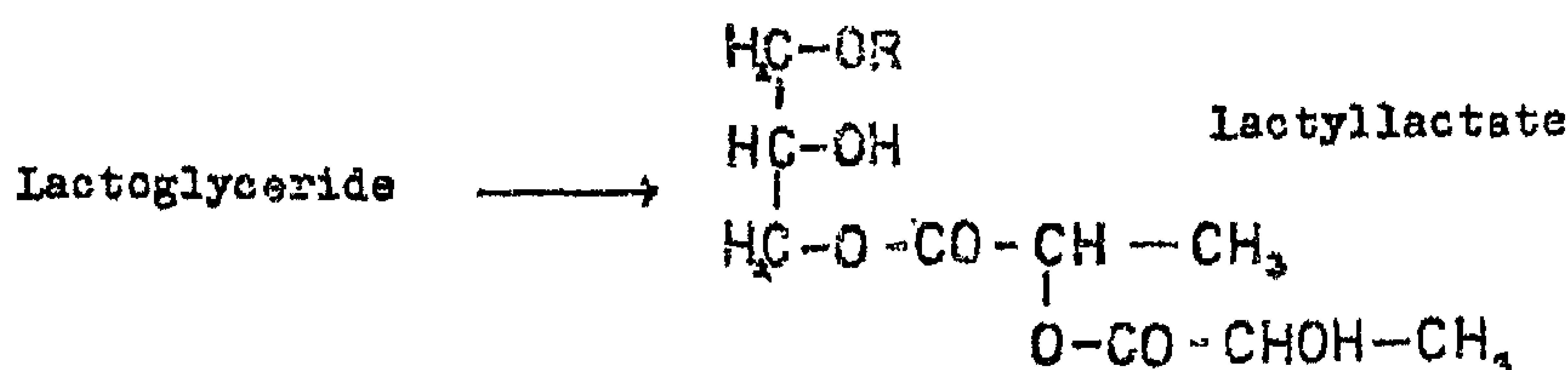


ويتم تحضير هذا المركب بتسخين أحادي الكلسريد مع Diacetyl tartaric acid anhydride الذي يمكن الحصول عليه بمفاعلة انهدريد حامض الخليك Acetic anhydride مع حامض التارتارك. ويستخدم المركب Diacetyl tartaric acid Monoglyceride في تحضير المعجنات.

ومن المركبات أيضاً في هذه المجموعة lactate Monoglyceride أو لاكتو-كلسريد Lactoglyceride وينتج عن تفاعل حامض اللاكتك مع أحادي الكلسريد. ويمكن

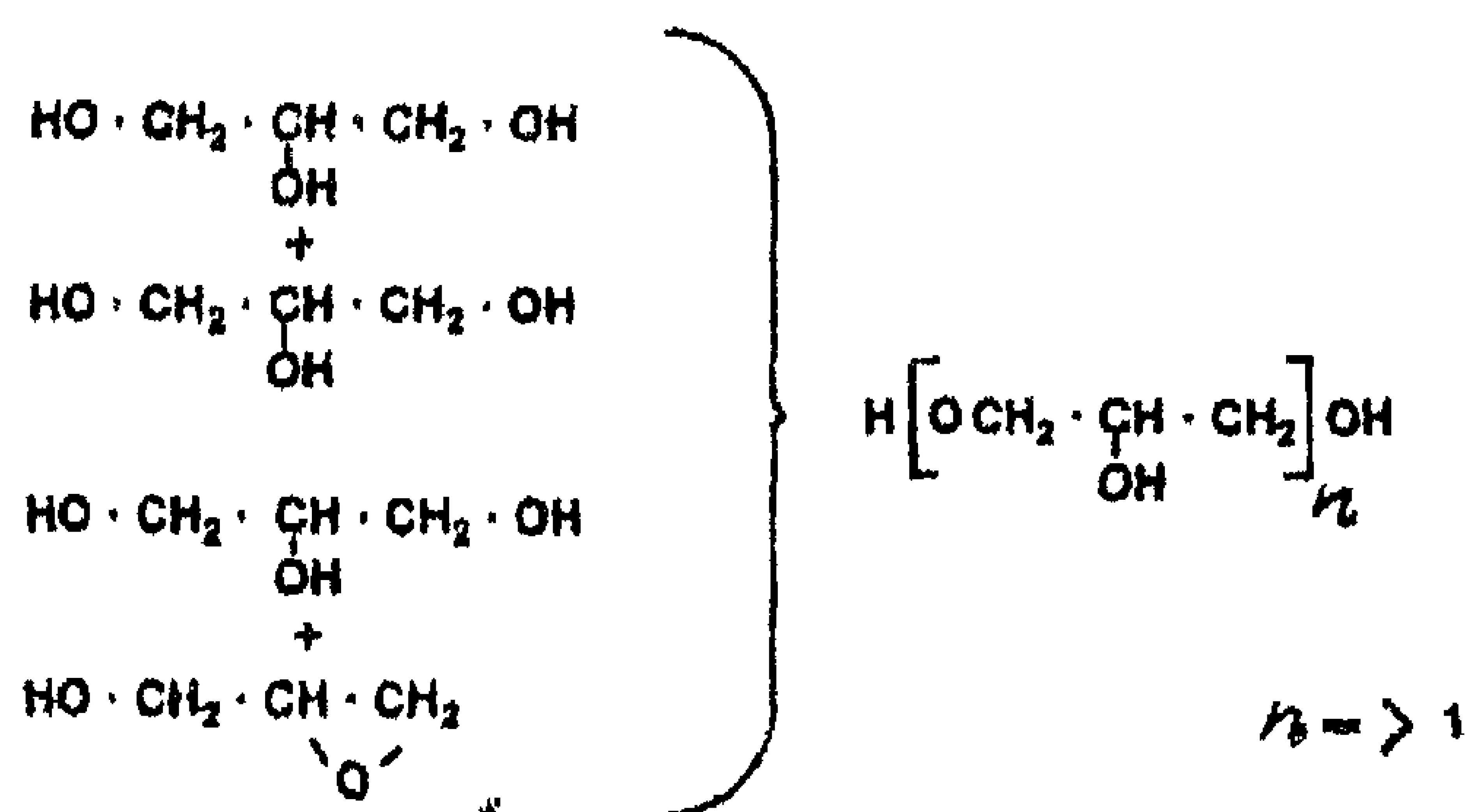


زيادة الخاصية المحبة للماء لهذا المركب بتفاعله مع حامض اللاكتك مرة ثانية ويتكون نتيجة لذلك المركب Lactyl lactate

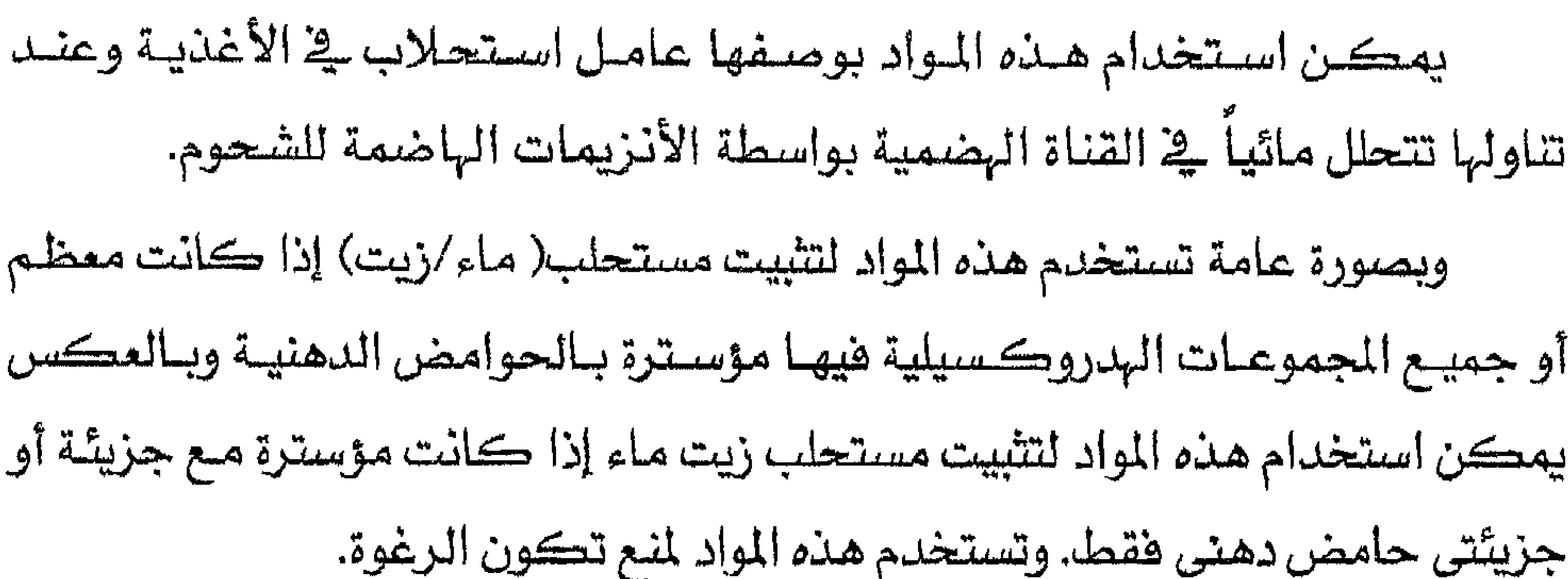


د. استرات عديد الكلسيرول Polyglycerol ester

وتحضر كالآتي (1) يسخن الكلسيرول بوجود قليل من هيدروكسيد الصوديوم وباستعمال درجات حرارة تزيد على 100°م. ويتكون نتيجة لذلك عديد الكلسيرول وذلك لفقدان الماء في أثناء التفاعل وفي الحقيقة فأن التسمية عديد الأثير أكثر دقة كما يتضح من تركيب الناتج:



ويكون الناتج في أعلاه ذا سلسلة تتراوح بين 2 و12 وحدة كلسيرول. (2) يمكن زيادة الخاصية الكارهة للماء لهذه المركبات بأسترتها مع الحوامض الدهنية H=R أو حامض دهني.



يمكن استخدام هذه المواد بوصفها عامل استحلاب في الأغذية وعند تناولها تتحلل مائياً في القناة الهضمية بواسطة الأنزيمات الهاضمة للشحوم.

وبصورة عامة تستخدم هذه المواد لتثبيت مستحلب(ماء/زيت) إذا كانت معظم أو جميع المجموعات الهدروكسيلية فيها مؤسترة بالحوامض الدهنية وبالعكس يمكن استخدام هذه المواد لتثبيت مستحلب زيت ماء إذا كانت مؤسترة مع جزيئة أو جزيئتي حامض دهني فقط. وتستخدم هذه المواد لمنع تكون الرغوة.

هـ. Propylene glycol ester

تحضر هذه الاسترات بتفاعل حامض دهني مع المركب ثنائي الهدروكسيل 1.2- Propylene glycol :



تستعمل هذه المركبات لتحضير مستحلبات ماء/ زيت. وعند تناولها تتحلل مائياً في القناة الهضمية إلى حوامض دهنية تمتص من الأمعاء أما المركب propylene glycol فيتم اطراحه عن طريق البول.

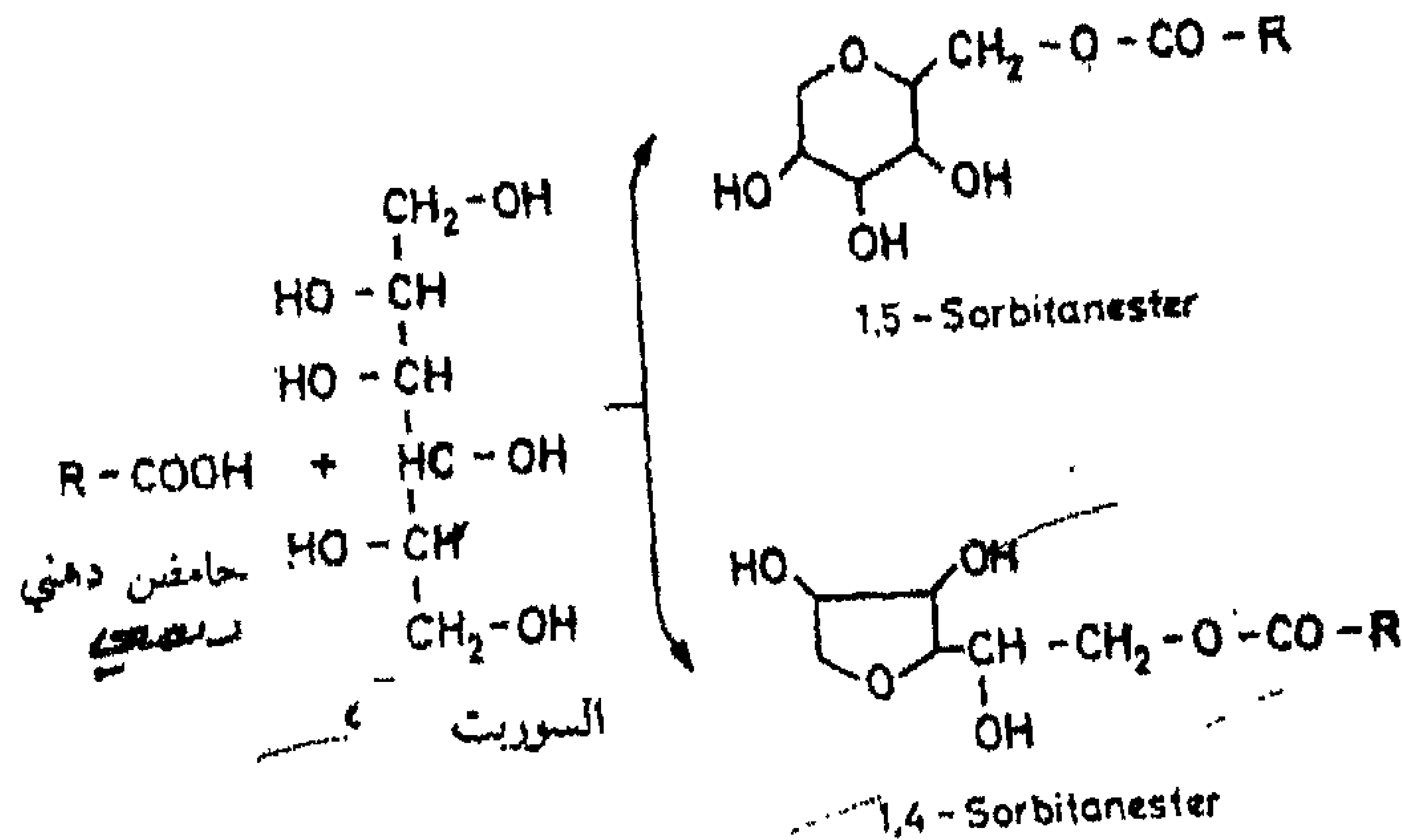
و- Sugar fatty acid ester

تتكون استرات السكريات مع الحوامض الدهنية نتيجة لتفاعل السكر (السكروز أو اللاكتوز) مع الحوامض الدهنية وكمثال:

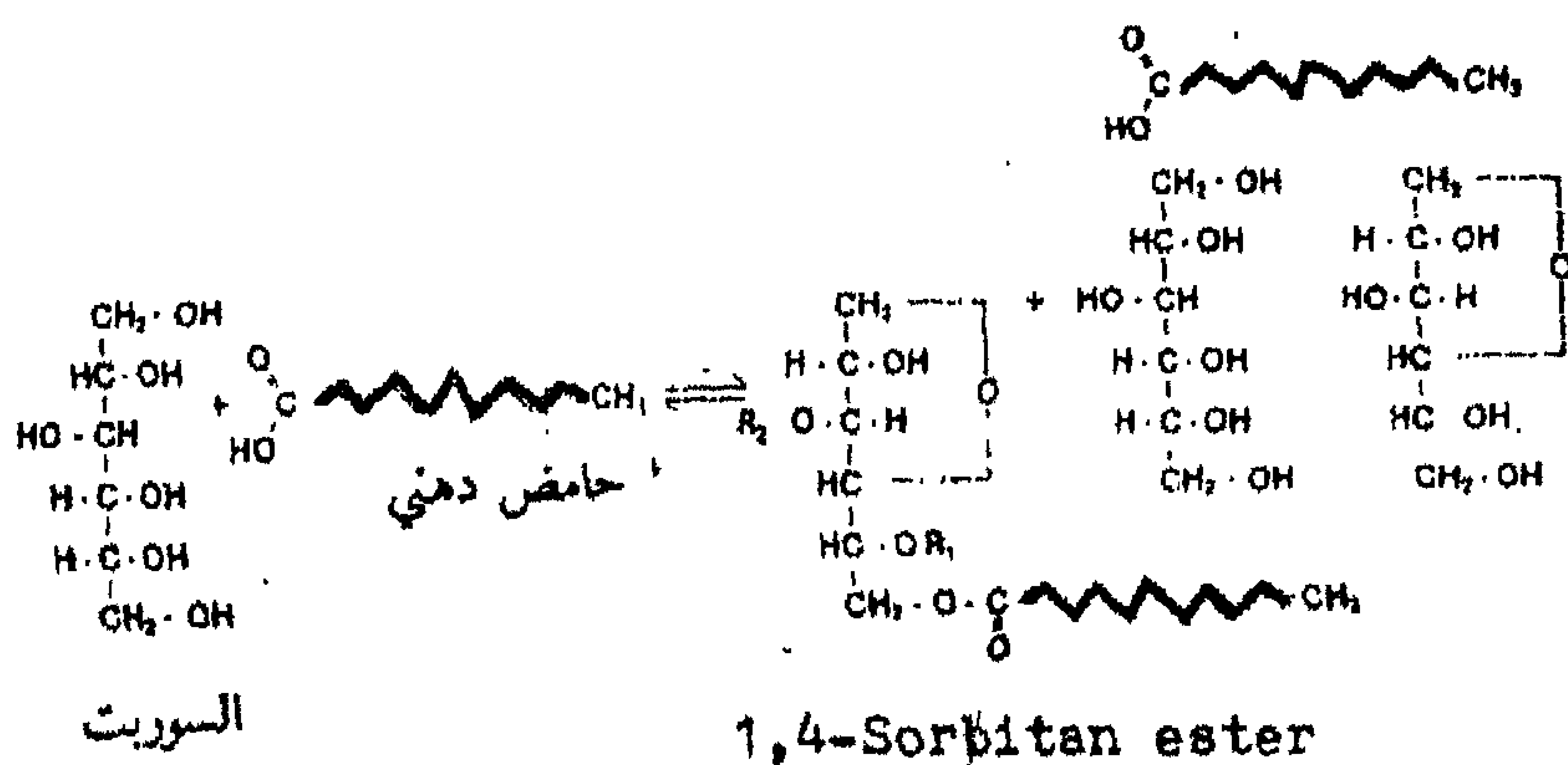
0 : 14 أو 0:16 أو 0:18 بوجود عامل مساعد أن هذه المركبات قابلة للتحلل المائي في الجسم وليس لها تأثيرات جانبية وتكون عديمة الطعم والرائحة كما تمتلك مدى واسعاً لقيمة HLB يتراوح بين 7-13 وتستخدم عادة لتثبيت مستحلب (زيت/ماء).

ز- Sorbitan fatty acid ester

يتكون استر السوربتان للحامض الدهني عند تسخين السوربيت Sorbit مع الحوامض الدهنية بوجود هدروكسيد الصوديوم او حامض الكبريتيك وبدرجة حرارة (180-250°م) ونتيجة للتفاعل يتكون المركبان 1.4- Sorbitan ester أو ..5- Sorbitan ester1



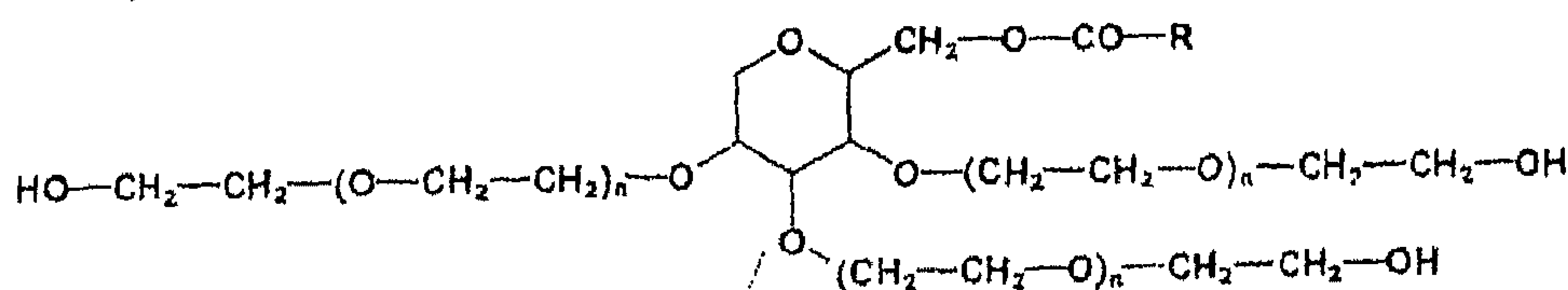
ويمكن توضيح التفاعل بشكل آخر وكما يأتي:



H- R_2 و R_1

ج- Polyoxyethylene- Sorbitan acid ester

يمكن زيادة الخاصية المحبة للماء (الهدروفيلية) لعامل الإستحلاب Sorbitan fatty acid ester وذلك بإدخال مجموعات polyoxyethylene ويتكون بذلك المركب الآتي:



ويستخدم هذا المركب لتثبيت مستحلب الزيت في الماء (زيت/ ماء).

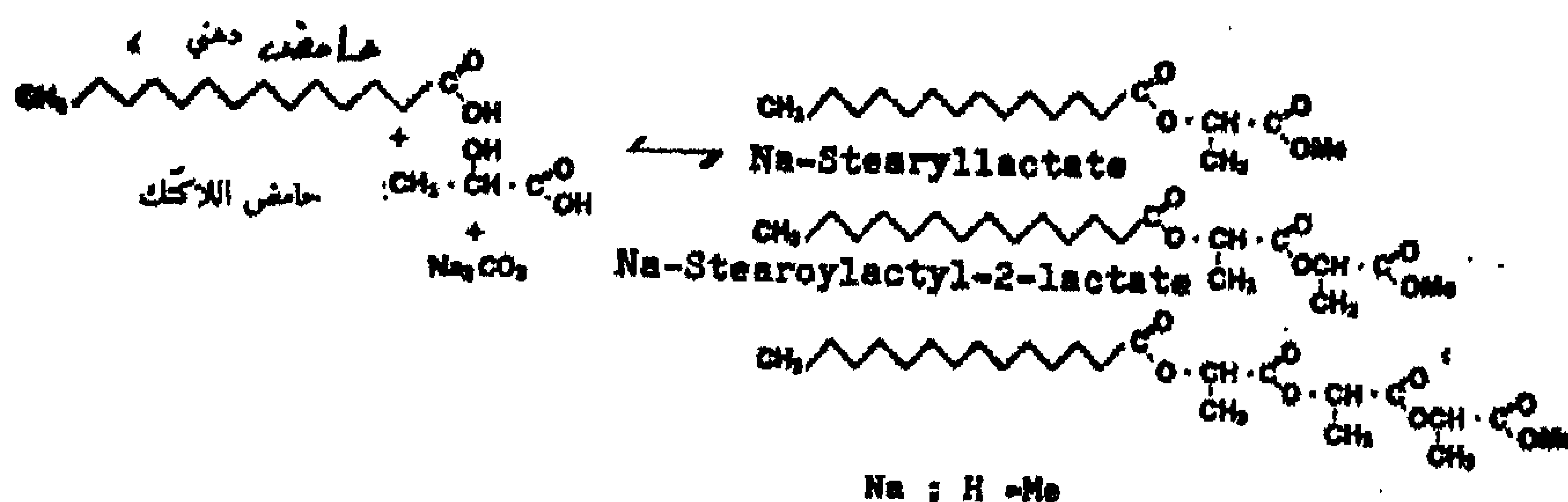
ط. Sodium stearoyllactyl-2- lactate

هذه الأنواع من المركبات استرات لحامض اللاكتك او عديد حامض اللاكتك Polyactie acid مع الحوامض الدهنية المشبعة.

يتم تحضير هذه المركبات بأسترة الحوامض الدهنية مع حامض اللاكتك بوجود قاعدة مثل Na_2CO_3 وتحصل الاسترة بتفاعل الهدروكسيل لحامض اللاكتك مع مجموعة الكاربوكسيل للحامض الدهني وبذلك ينتج اسيل حامض اللاكتك Acyllactic ويسمى الناتج Stearoyl lactic.

ويمكن لمجموعة الكاربوكسيل في شمالة حامض اللاكتك أن تتفاعل مع مجموعة الهدروكسيل لجزيئة حامض لاكتك أخرى ويتكون نتيجة لذلك Stearoyl polyactic acid وهكذا يتصرف حامض اللاكتك تارة بمثابة كحول وأخرى حامض لتكوين الاسترات.

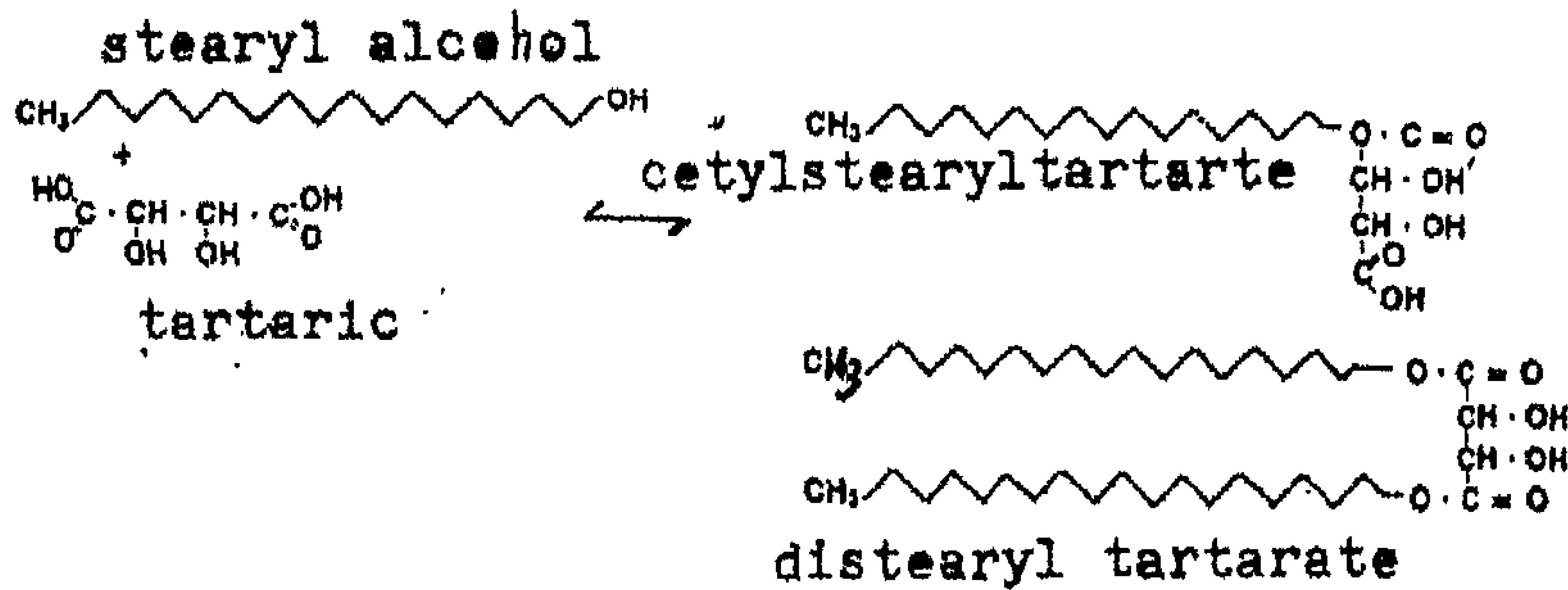
تظهر نواتج التفاعل بشكل حامض أو ملح وكما يأتي:



وتستخدم هذه المركبات لتثبيت مستحلبات الزيت في ماء.

ي. Stearyl tartarate

إن هذا المركب استر الكحول الدهني المشبع مع حامض التارتارك وتطلق التسمية Stearyl على شمالة الكحول الدهني المشبع المشتق من حامض الستيارك الحاوي على 18 ذرة كربون. وتدعى هذه المركبات أحياناً Cetylstearyl tartarate وهي أكثر دقة من التسمية القديمة Stearyl tartarate. تحضر هذه المركبات باسترة حامض التارتارك مع Stearyl alcohol.



ويتكـون نتيجـة لـذلك Monostearyl tartarate و Distearyl tartarate تمتص هذه المركبات عادة من الأمعاء بكميات قليلة جدا.

14-13-4 طبيعة التآثرات بين عوامل الاستحلاب ومكونات الغذاء المختلفة :

وضحنا فيما تقدم أمثلة عديدة لعوامل استحلاب يمكن استخدامها في الأغذية وسنوضح فيما يلي طبيعة التآثرات بين عوامل الإستحلاب والمكونات الغذائية.

أ- التآثرات بين عوامل الإستحلاب والبروتينات

Interaction between emulsifiers and proteins

1- التـآثرات الكارهـة للمـاء (الهدروفوبيـة) بـين البروتين وعامـل الإسـتحلاب وتحصل بين مجموعات السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية المكونة للبروتين من جهةوالسلسلة الهدروكربونية لعامل الإستحلاب من جهة أخرى وتحصل هذه التآثرات في المحيط المائي حيث تتجه المجموعات الكارهة للماء لكل من عامـل الإسـتحلاب والبروتين بعضها إلى بعض ونتيجـة لـذلك تحجب هـذه المجموعات نفسها عن الماء فيما تكون المجموعات القطبية لعامل الإستحلاب على سطح الجسيمات المذيلات Micelles المتكونة شكل 4-3.

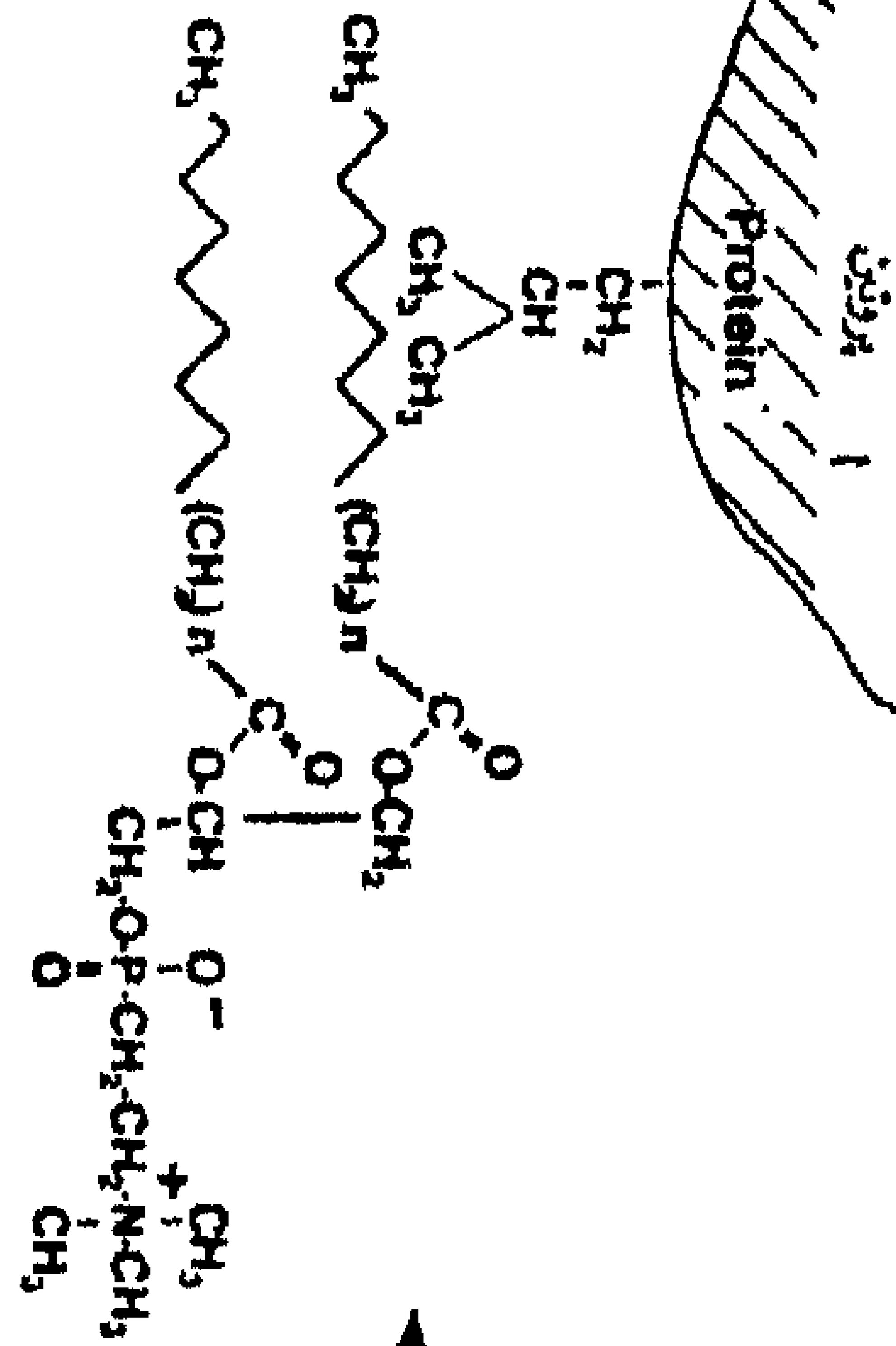
2- التآثرات الهدروجينية بين عامل الإستحلاب والبروتين: تتآثر السلاسل الجانبية القطبية غيرالمشحونة للبروتينات مع المجموعة المحبة للماء في عامل الإستحلاب مكونـة آواصـر هدروجينيـة كمـا في الـشكل (4-4). أمـا الـسلاسل الهدروكربونية لعامل الإستحلاب فتتجه نحو سطح المذيلة Micelle

3- التآثرات الكهروستاتية Electrostatic بين عامل الإستحلاب والبروتين:

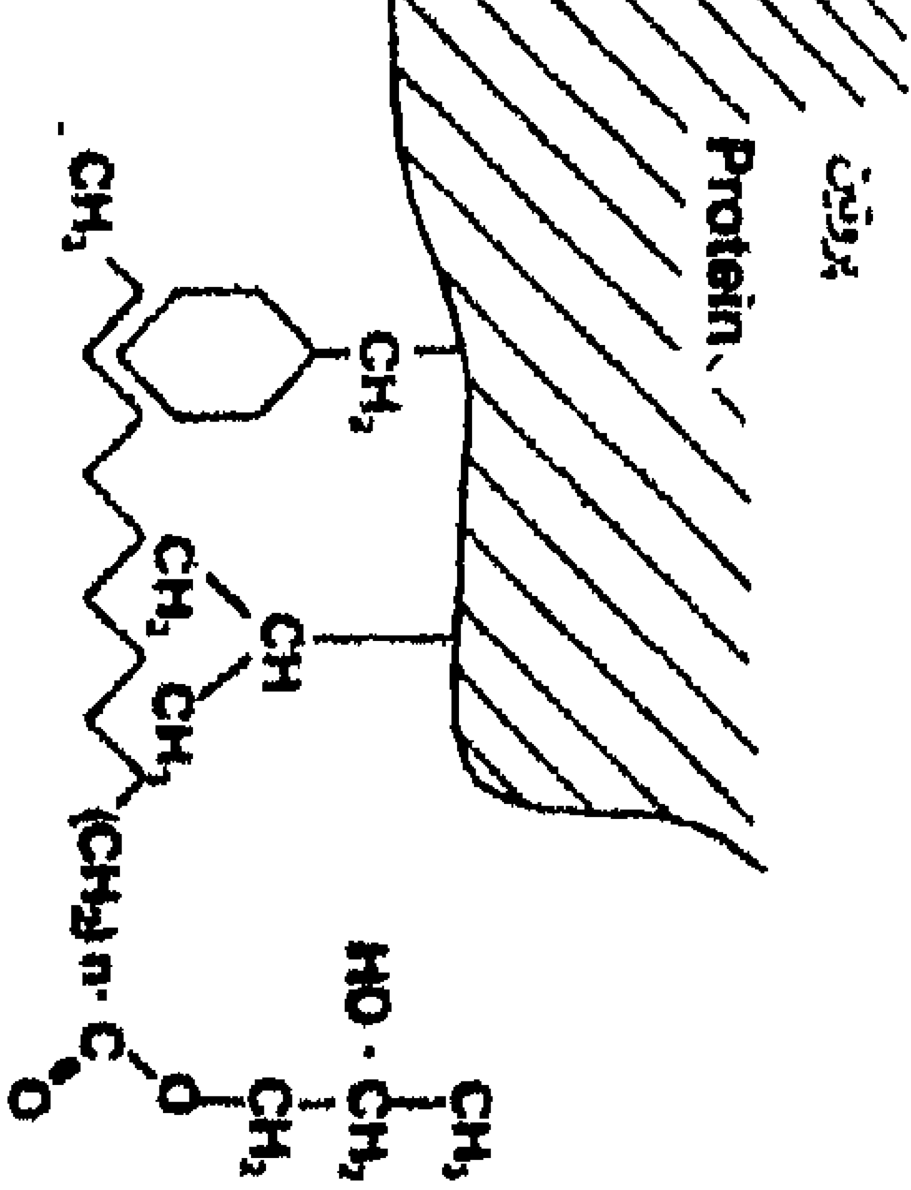
يوضح الشكل 4-5 التآثرات بين السلاسل الجانبية المشحونة في البروتين والشحنات المخالفة لها في جزيئة عامل الإستحلاب.

شكل (4-3) التآثرات الكارهة الماء بين البروتين وعامل الاستحلاب.

السلاسل الهيدروفوبية للاحماض الامينية وتكون قليلة الذوبان في الماء		
Alanine	$-CH_3$	النين
Valine	$-CH(CH_3)_2$	فالين
Leucine	$-CH_2-CH(CH_3)_2$	لوسين
Isoleucine	$-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$	ايزولوسين
Prolinc	CH_2-CH_2, $N(H)-CH_2$	برولين
Phenylalanine	$-CH_2-C_6H_5$	فنيل النين
Tryptophan	$-CH_2-C=CH-NH$ (indole)	تربتوفان
Methionine	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$	



هنا تظهر الاصرة الهدروفوبية بين ثمالة اللوسسين في جزيئة البروتين مع السلسلة الهدروكربونية في جزيئة اللسثين



هنا تظهر الاصرة الهدروفوبية بين ثمالة كل من الحامضين الامينيين فنيل النين وفالين في البروتين مع السلسلة الهدروكربونية في Propylenglycomonostearate

شكل (4-4) التآثرات الهدروجينية بين عامل الاستحلاب والبروتين.

الأحماض الأمينية ذات السلاسل الجانبية القطبية غير المشحونة	
Glycine -H	
Serine -CH$_2$OH	
Threonine -CH(OH)CH$_3$	
Cysteine -CH$_2$SH	
Tyrosine -CH$_2$-C$_6$H$_4$-OH	
Asparagine -CH$_2$C(O)NH$_2$	
Glutamine -CH$_2$CH$_2$C(O)NH$_2$	

الأصرة الكهروستاتية بين فضالة الأرجنين في وعامل الاستحلاب.

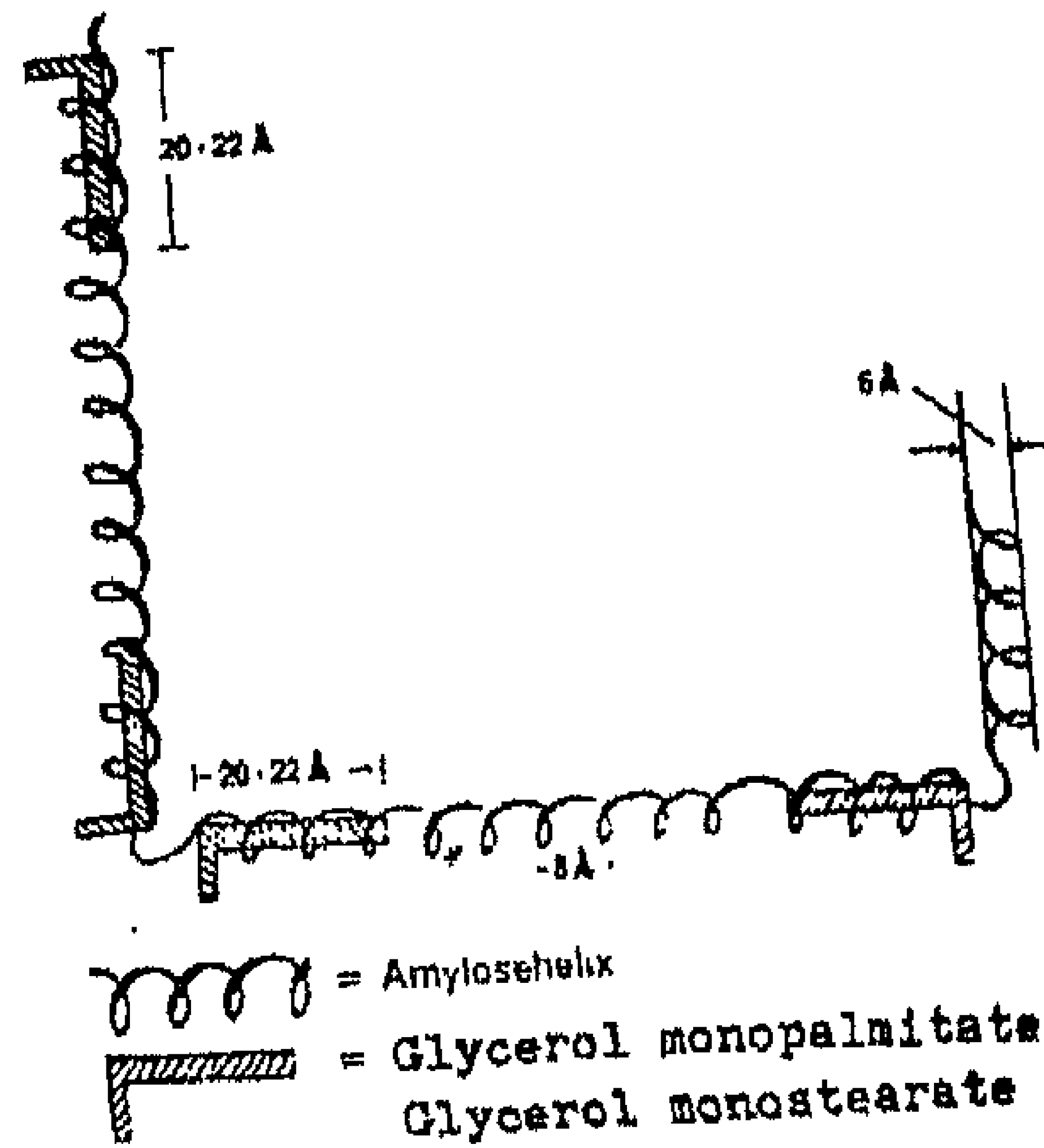
الأصرة الكهروستاتية بين فضالة الأسبارجين في البروتين والشحم الفسفاتي (عامل الاستحلاب) من خلال أيونات الكالسيوم

شكل (4-5) التأثرات الكهروستاتية بين عامل الاستحلاب والبروتين

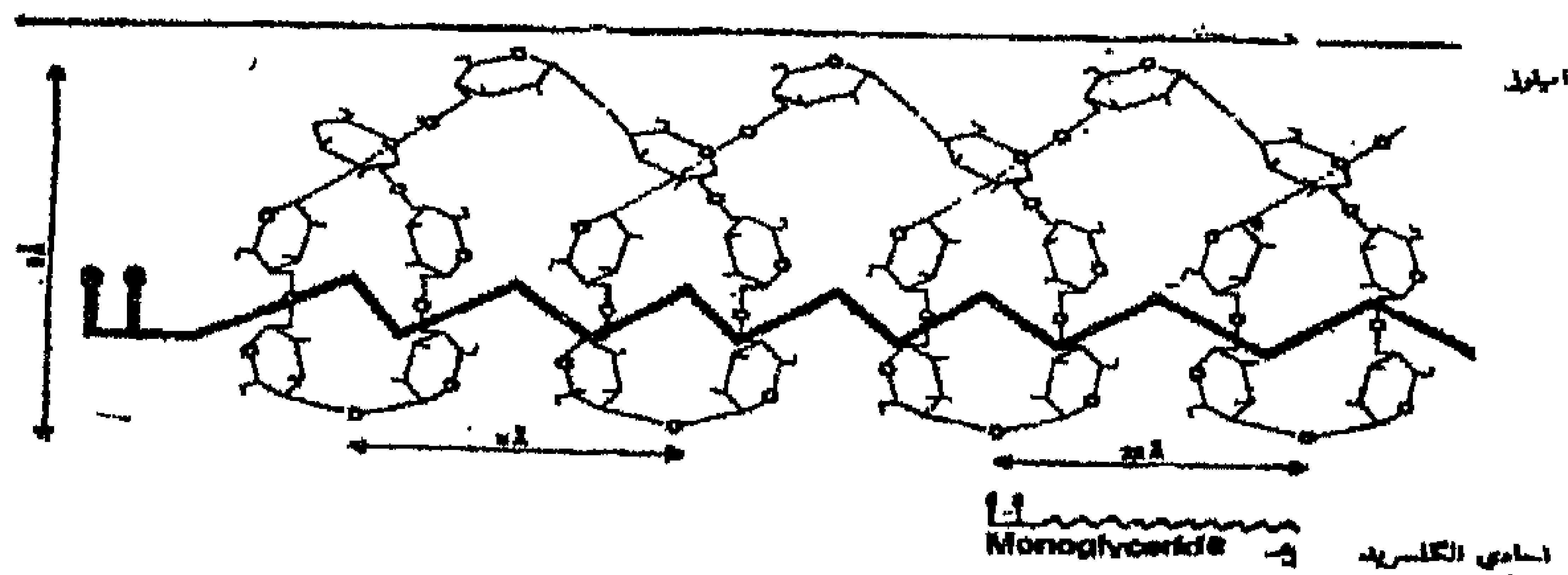
ب- التأثرات بين الكربوهيدرات وعوامل الإستحلاب

لا تمتلك احاديات وقليلات السكريد جيدة الذوبان في الماء، مناطق كارهة للماء ولهذا لا يتوقع أي تآثر هدروفوبي لهذه المركبات مع عوامل الإستحلاب. أما عديدات السكريد فعلى العكس من ذلك تمتلك مناطق كارهة للماء ولهذا تلعب دورا كبيرا في الأغذية.

يتخذ الاميلوز مثلا بتأثير الماء تركيبا لولبيا يسمى اللولب –الفا (α-Helix)، وبالتالي فأن الجزء الداخلي لهذا اللولب يمتلك صفة كارهة للماء Hydrophobic. وتستطيع عوامل الإستحلاب لذلك التآثر مع الجزء الداخلي في اللولب- الفا للاميلوز وتكون معه اواصر هدروفوبية كما في الشكل 4-6 الذي يبين التآثرات بين أحادي الكلسريد والاميلوز ويمكن توضيح الشكل 4-6 بالمخطط الآتي:



شكل (4-6) التآثر الهيدروفوبي (كاره الماء) بين الأميلوز وعوامل الاستحلاب Glycerol monopalmitate و Glycerol monosstearate.

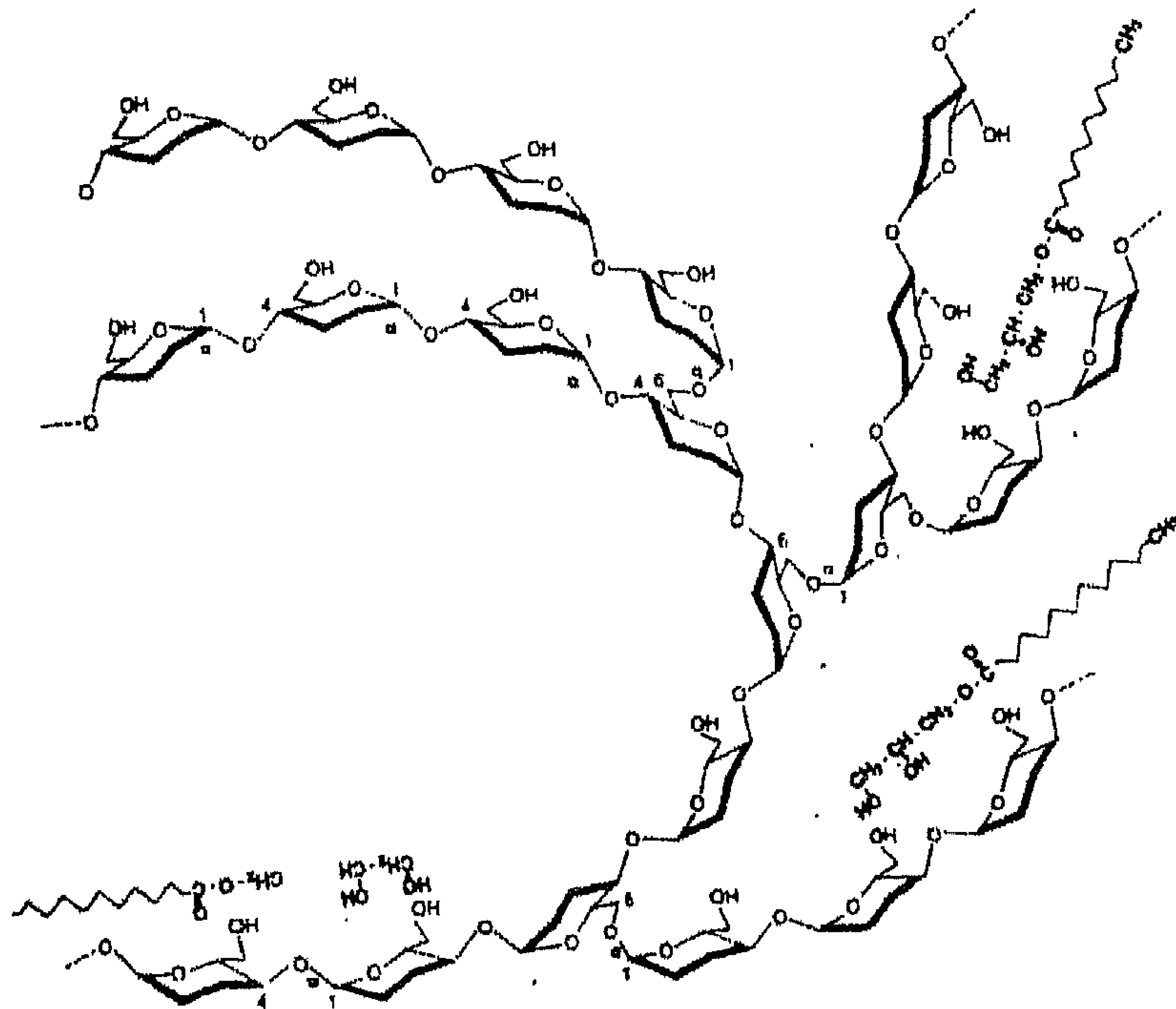


ينفصل الاميلوز من محلوله ويترسب بعد فترة زمنية من تحضير المحلول الطازج ويعود السبب في ذلك إلى انفتاح اللولب- الفا واتخاذ الجزيئة شكلا مستقيما وتسمى هذه الظاهرة التردي Retrogradation. تقترب الجزيئات المستقيمة من بعضها وتصبح بشكل مذيلات غير ذائبة كما هي الحال مع السليلوز غير الذائب. ولا يمكن إرجاع

جزيئات الإميلوز إلى شكلها اللولبي بالتسخين. ويمكن تأخير عملية التردي Retrogadation أو منعها كلية بإضافة بعض المواد مثل أحاديات الكلسريد حيث يتكون معقد اشبه ما يكون بهيئة القفل والمفتاح كما في المخطط أعلاه. إن تكوني هذه المعقد يمنع تحول الشكل اللوبي للاميلوز إلى شكل مستقيم. إن عملية التردي هي إحدى الأسباب التي تجعل الخبز أو الصمون بحالة صلبة بعد فترة قصيرة من الخزن ولقد عرف منذ زمن طويل بأن إضافة الدهن للمعجنات والخبز يؤدي إلى بقائها لفترة اطول بحالة طازجة والسبب يعود إلى تكوين المعقد المذكور بين الدهن والإميلوز.

ب. التأثرات بين عوامل الإستحلاب والكربوهيدرات بواسطة الأواصر الهدروجينية :

يمكن توضيح هذه الأواصر بين الأجزاء المحبة للماء في جزيئة الاميلوبكتين وعامل الإستحلاب كما في الشكل (4-7).



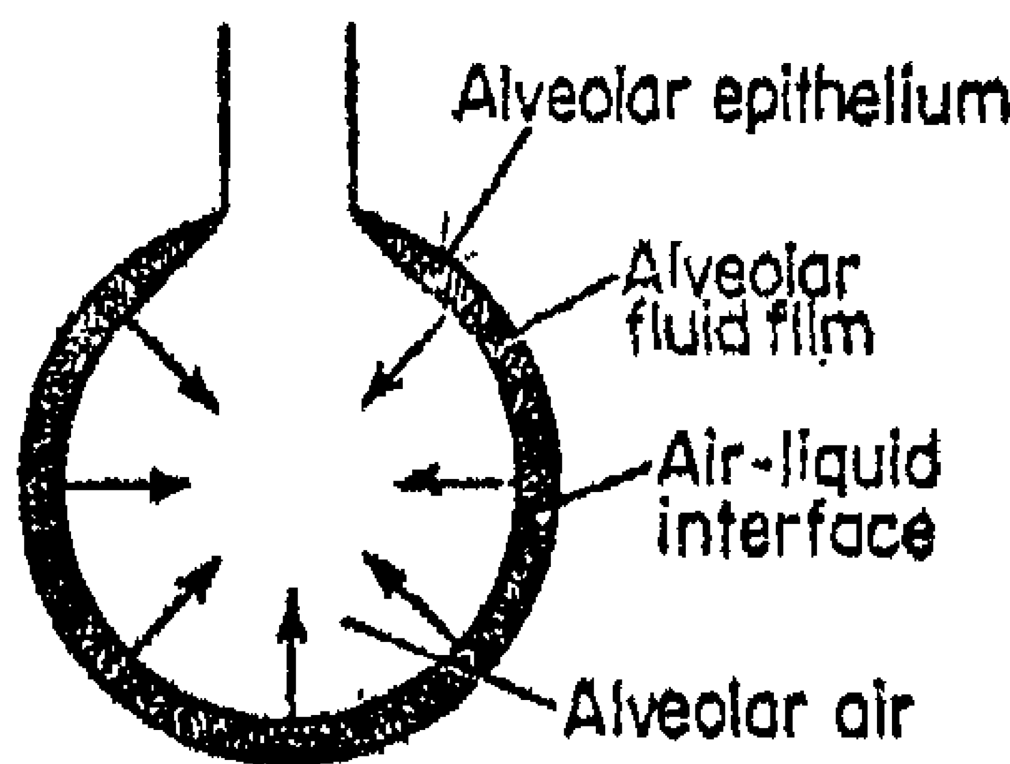
شكل (4-7) التاثر بين عامل الاستحلاب والأميلوبكتين بواسطة الأواصر الهدورجينية.

13-5 دور املاح الصفراء بوصفها عوامل إستحلاب في الأمعاء الدقيقة :

تخفض أملاح الصفراء التوتر السطحي لقطيرات الدهن في المعي الإثني عشر وبذلك توتر السطح البيني Interfacial بين الشحم والأطوار المائية كذلك وهذا يجعل القطيرات الصغيرة تنساب خارج سطح قطيرات الدهن الكبيرة مكونة مستحلباً ثابتاً في الماء.

4-13-6 دور عوامل الاستحلاب في الرئة :

تحدد مطاوعة الرئة أو قابلية تمددها Compliance, Strechability بالشد السطحي للسائل المغلف للسطوح الداخلية للحويصلات الرئوية. إن الشد السطحي لهذا السائل يميل إلى إقلال مساحة السطوح الداخلية للحويصلات وذلك بسحب جدران الحويصلات مع طبقة السائل الملتصق بها تجاه تجويف الحويصلة (شكل 4-8). إن هذا يزيد من قابلية الرئتين للإرتداد Recoil من الجدار الصدري Thoracide wall كما يبقي الرئتين بحالة إنخماص عندما يكون الجنين في الرحم. أما ما بعد الولادة، فان الغشاء المخاطي للحويصلات يفرز عاملاً فعالاً في السطوح وهو بروتين شحمي بطبيعته ويحتوي Dipalmitoyl phosphatidylcholine



الغشاء المخاطي للحويصلات

طبقة السائل الملتص بالحويصلات

السطح البيني هواء - سائل

هواء الحويصلات

شكل (4-8) الشد السطحي لطبقة السائل الملتصق بالحويصلة الرئوية يسحب جدران الحويصلات وتميل الحويصلات لذلك للإنخماص Collapse.

وتوجد جزيئاته بتركيز أكبر على السطح الحر لطبقة السائل الملتصق بالحويصلات مؤدية إلى خفض شدها السطحي وهذا يمنع إنخماص الحويصلات الرئوية. فعند الزفير، تفرغ الحويصلات من الهواء ويقل قطرها وبذلك تقترب جزيئات العامل الفعال في السطوح Surfactant من بعضها وحيث تكون موجودة في السطح البيني هواء- سائل، تؤدي إلى خفض الشد السطحي لطبقة السائل الملتصقة بالحويصلات مانعة بذلك الخماص الرئتين وهي في حالة الزفير. وعند الشهيق تنتفخ الرئتان وتمتد طبقة السائل الملتصقة بالحويصلات مما يؤدي إلى تباعد جزيئات العامل الفعال في السطوح عن بعضها مما يقلل من تأثيرها أي أن الشد السطحي للسائل يزداد مما يساعد في الإرتداد المطاطي للرئتين في حالة الشهيق.

4-13-7 إستخدام عوامل الإستحلاب لتكوين الجسيمات الشحمية Liposomes :

يمكن استخدام عوامل الإستحلاب لتكوين مذيلات Micelles تضم في داخلها عقاقير أو أنزيمات وتسمى هذه الجسيمات بالجسيمات الشحمية. إذ أن من اهم المعوقات في إستخدام العلاج الكيميائي عدم تخصص العقار في عمله على نسيج معين حيث أن العقار المتناول عن طريق الفم أو المزروق في الوريد ينتشر في أنسجة الجسم المختلفة ولا يتركز في النسيج الهدف وهذا أساس السمية في أحيان كثيرة. إضافة إلى ذلك فأن بعض العقاقير تكون عرضة للعمليات الأيضية بحيث يكون نصف عمرها- بالصيغة الفعالة- قصيراً نسبياً. ولقد إستخدمت الجسيمات الشحمية الحاوية على العقاقير أو الأنزيمات وسائط لنقل هذه المواد إلى الأنسجة الهدف.

إن الجسيمات الشحمية المحضرة من الشحوم الفسفاتية والكلولسترول غير سامة وقابلة للنكوص الحيوي Biodegradable.

ولقد جرت محاولات عديدة لتحضير جسيمات شحمية تؤدي مفعولها في أنسجة مستهدفة محددة. كما أن هذه الجسيمات تطيل من مفعول العقاقير المحفظة Encapsulated فيها ومن المؤمل أن يواكب التقدم في معرفتنا لتركيب وكيمياء الأغشية الحيوية، تحضير جسيمات شحمية ذات درجة عالية من التخصص بحيث يمكن إستخدامها لنقل العقاقير وحتى إستبدال بعض الأنزيمات في أنسجة مستهدفة.

14-4 المصادر المعتمدة

1. Schuster, G. Adams. W. Zeitschrift fur Lebensm. Techn. U. Verfahrenstechik Emulgatoren als Zusatzstoffe fur Lebensmittle, 4, 1981.
2. Schuster, G. Adams, W. Zeitschrift fur Lebensm. Techn. U. Verfahrenstechik Emulgatoren als Zusatzstoffe fur Lebensmittle, 2,1981.
3. Schuster, G. Adams, W. IBID. 7,1982.
4. IBID.1. 1984.
5. Debajyoti Das. Biophysics and Biophysical chemistry Academic publishers. Calcutta. New Delhi, 1982.
6. Belitz. H.D. Grosch. W. Lehrbuch der Lebensmittel chemie, Zweiteauflage, Springer- Verlag, 1985.
7. Devlin, T.M. Textbook of Biochemistry with clinical correlations, 2nd edn. Wiley Medical publication, New York. Chichester. 1986.
8. Conn. E.E. Stumpf. P.K. Bruening, G. & Doi, R.H. Outlines of Biochemistry, 5/E. John Wiley & Sons. New York. Chichoster, 1987.

قائمة بالأشكال

إلى

شكل 2-33 تثبيط أنزيم Pectinesterase البرتقال بوجود الأحماض المثبطة.

قائمة بالجداول

جدول 2-6 الأصناف الثانوية لأنزيمات الهدرولاز تبعاً لطبيعة الأصرة التي تحفز تحللها المائي.

جدول 2-7 توضيح لتخصص أنزيم الليباز البنكرياسي لموقع الآصرة التي يحفز تحللها المائي.

جدول 2-8 التخصص للركيزة لأنزيم ال Achlhydrolase النقي من البطاطا

جدول 2-9 التخصص النسبي للركيزة لأنزيمات الفسفاتاز الحامضية من المصادر الثلاثة: الخميرة وكريات الدم الحمراء والبروستات.

جدول 2-10 النشاط النسبي لأنزيم الفسفاتاز القاعدي للبكتريا E.coli تجاه الركائز الفسفاتية المختلفة.

جدول2-11 تصنيف وتخصص الكلايكوسيداز والكلايكاناز

جدول 2-12 السرع النسبية للتفاعلات المحفزة بأنزيم ال Maltase و α-Methylglucosidase بوجود الركائز المختلفة.

جدول 2-13 تسلسل الأحماض الأمينية حول ثمالات السريل Seryl والهستديل Histidyl الجوهرية في الموقع النشط لعدد من الأنزيمات.

جدول 2-14 تسلسل الأحماض الأمينية حول مجاميع الإميدازل (لثمالة الهستدين) والسلفهدريل الجوهرية لعدد من بروتيازات السلفهدريل Sulfhydryl proteases.

جدول 2-15 بعض خصائص البروتيازات.

جدول 3-1 تغير تراكيز النواتج في عملية الإختمار الكحولي التي تحصل في الخميرة Saccharamyces cerevisiae مع تغير الرقم الهدروجيني لمحلول الركيزة (كلوكوز).

جدول 3-2 نواتج الإختمار لثلاثة أنواع مهمة صناعياً من الكلوستريديوم Clostridium.

المصطلحات المعربة

A

Active site الموقع النشط

activity نشاط ، فاعلية، فعالية

acyl اسيل

Adenosine ادينوسين

Adipose tissue النسيج الدهني

Aerobic هوائي

aldehyde الدهيد

alternate متناوب

Amphilibolic متقالب

amylase اميلاز

Anabolism ابتناء

Anaerobic لاهوائي

Analogous مضاهي

anomer انومر

Apoenzyme صميم الأنزيم

اسبارجين Asparagines

لاتناظر asymmetry

موصدة Autoclave

ذاتية الاغتذاء autotrophic

B

عصيات Bacilli

عاثية الجراثيم Bacteriophage

تخليق biosynthesis

انحلال breakdown

دارىء buffer

C

كلسيتونين Calcitonin

كربكسلة Carboxylation

كربوكسي ببتيداز Carboxypeptidase

تقويض catobolism

كاتالاز catalase

تحفيز catalysis

خلابة chelate

كروماتين Chromation

Chylomicrons كليوميكرونات

cis مقرون

cleave يشطر

Coenzyme تميم الأنزيم

Cofactor تميم العامل

Configuratiom شاكلة

Cconformation هيأة

conjugated مقترن

Conjugated proteins البروتينات المقترنة

contractile قلوص

Conventions اصطلاحات

convulsions اختلاجات

culture مستنبت

Cysteine ستئين

cystine سستين

Cytidine سيتدين

cytosine سيوزين

D

Decarboxylase فارغة الكربوكسيل

Decarboxylation نزع الكربوكسيل

decomposition تفكك

degradation نكوص

Dehydration تجفاف

Dehydrogenase نازع الهدروجين

Dehydrogenation نزع الهدروجين

denaturation تمسخ

Deoxyribon clease ديوكسي ريبونيوكلياز

Deoxyribonucleotide الحمض النووي الديوكسي ريبي

dihydroxyacctone ديوكسي ريبوكليوتيد

dipeptidase داي ببتداز

dipolar ثنائي الاستقطاب

disaccharide ثنائي السكريد

dissociation تفارق

Donor مانح

Duct قناة

Duplex مزدوج

dwarfism قزامة

E

Emema وذمة

Electrophoresis رحلان كهربائي

elimination اطراح

Emulsifcation استحلاب

emulsifier مستحلب

emulsion مستحلب

Endergonic مستهلك للطاقة

Endoplasmic reticulum الشبكة الهيولية الباطنية

enhance يعزز

Enterokinase انتروكيناز

enzyme أنزيم

Epimer ايبمر

Epithelial ظهاري

Equilibrium توازن

esterase استراز

Eucaryote حقيقية النواة

evolve يطور

Excitability استثارية

excretion افراغ

Exergonic مطلق للطاقة

Extracellular خارج الخلايا

extinction انطفائية

F

Fat دهن

Fatty دهني

Feed back تلقيم راجع

Fermentation اختمار

fuctional وظيفي

fungi فطريات

G

Galactose كلاكتوز

Gastrointestinal معدي – معوي

generation جيل

globulin كلوبلين

Glucogenic مكون للكلوكوز

Gluconeogenesis استحداث السكر

glucose كلوكوز

Glutamate كلونامات

Glyceraldehydes كلسر الدهيد

glycerol كلسرول

glycine كليسين

Glycogenesis تكون الكليكوجين

glycolipids شحوم سكرية

glycolysis تحلل السكر

Glycoproteins بروتينات سكرية

glycoside كاليكلوزيد

guanosine كوانوسين

H

Heteropolysaccharide متغاير عديد السكريد

heterotrophic غيرية الإغتداء

heterotropic غير متجانس

histones هسونات

Holoenzyme الأنزيم التام

homotropic متجانس

hydrocarbon هدروكرنون

hydrolase هدرولاز

hydrolysis حلمهة أو تحلل المائي

Hydrophilic اليف الماء

Hydrophobic كاره الماء

Hydrpthalamus الوطاء

Hydroxylatisn هدركسلة

I

impermeable غير نفوذ

impulse دفعة

Incorporation اندماج

induce يحرض

Infection خمج

Informational اعلامي

inhibitor مثبط

inject يزرق

Insulin انيولسن

Finter face طور بيني

interaction تآثر

intermediary وسيطي

Intestinal flora النبيت الجرثومي المعوي

Intestinal lumen اللمعة المعوية

In vitro في الزجاج

In vivo في الحي

isoelectric تساوي التكهرب

Isoelectric point نقطة تساوي التكهرب

isoenzyme ايزو انزيم

Isoio nic ايزو ايوني

isomer ايزو (سابقة)، زمير

Isomerase ايزومراز

Isomerism تزامر

Isomerization مزامرة

K

Kinase كيناز

Ketogenic مولد الكتيون

L

Labeled موسوم

Lactate لاكتات

Lactation در اللبن

almellar صفاحي

layer طبقة

Ligase ليغاز

Linear خطي

Lipase ليباز

lipids شحميات

Lipoproteins بروتينات شحمية

lumen لمعة

Lyase ليباز
Lymphoid لمفي
lysosome الليسوزوم
lysozyme ليسوزيم

M

Maltose مالتوز
Mammary ثديي
matrix مطرق
Mechanism آلية
mediator وسيط
Metabolic ايضي
Metabolite مئيضة
Methionine مثيونين
micolle مذيلة
Microbial جرثومي
Mitochondria مايتوكوندريا
Mobilization تحريك
moiety جزء
Mononucleotide أحادي النيوكليوتيد
monosaccharido أحادي السكريد

Mucopolysaccharide عديد السكريد المخاطي

mutatns طوافر

mucosa مخاطي

Mycobacteria البكتريا المتفطرة

mycoplasma المفطورة

mylein ميلين

N

Nonpolar غير قطبي

Notation مجموعة رموز

nucleoplasm الجبلة النووية

O

Oil زيت

Oleic acid حمض الأوليك

oligomer قليل الوحدات

Oligopeptide قليل الببتيد

Oligosaccharide قليل السكريد

optical بصري

Optimum امثل

oxidase اكسيداز

Oxidative تأكسدي

Oxidative phosphorylation الفسفرة التأكسدية

oxidoreductase أنزيم الأكسدة المرجعة

P

Parent ابوى

Pathogenic ممرض

pathological مرضى

pathway مسلك

pepsin ببسين

Pepsinogen ببسينوجين

peptidase ببتيداز

Permeable نفيذ

Permeability نفيذية

pernicious وبيل

Pernicious anemia فقر الدم الوبيل

Perpective represontation التمثيل المنطوري

PH الرقم الهدروجيني

Phospholipids فسفاتاز

Phospholipids الشحوم الفسفاتية

Phosphorylation فسفرة

piomentsصباغ

Polymorase بوليمراز

Polymerase بوليمراز

polymer بوليمر

Polypoptide عديد الببلتيد

Polysaccharide عديد السكريد

Portat voin الوريد البابي

precursor سلف

primitive بدائي

Projection اسقاطي

procaryote بدائي النواة

prolactin بولكتين

promote يعزز

Promoter محضض

Prostaglandin بروستكلندين

prosthetic ضميم

Prosthetic group المجموعة الضميمة

proteolipids الشحوم البروتينة

provitamin سلف الفيتامين

pyranose بايرنوز

pyrophosphate بيروفسفات

pyrimidine بريمدين

Pyruvate kinase كيناز البيروفات

R

Racemic رزيمي

Receptor مستقبل، متقبل

redox أكسدة مرجعة

Regulator منظم

residue ثمالة

Resorption ارتشاف

reversal انعكاس

Reverible عكوس

Ribonuclase lease ريبونيوكلياز

Ribonucleic acid الحمض النووي الريبي

ribonucleoside ريبونيوكليوسيد

ribose ريبوز

Ribosome رايبوسوم

rickets كساح

S

Saponification صوبنة

semi نصف (سابقة)

Sheath غمد

shunt تحويلة

Soret سوريت

Species نوع

Specific نوعي

Specificity نوعية، خصوصية

Sphingolipids الشحوم السفنغولية

starvation مخصمة

stereo فراغي

Stererochemistry الكيمياء الفراغية

steroisemerism التزامر الفراغي

steroid ستروويد

Stimulate ينبه، يثير

strand سلسلة

Streptococeal عقدي

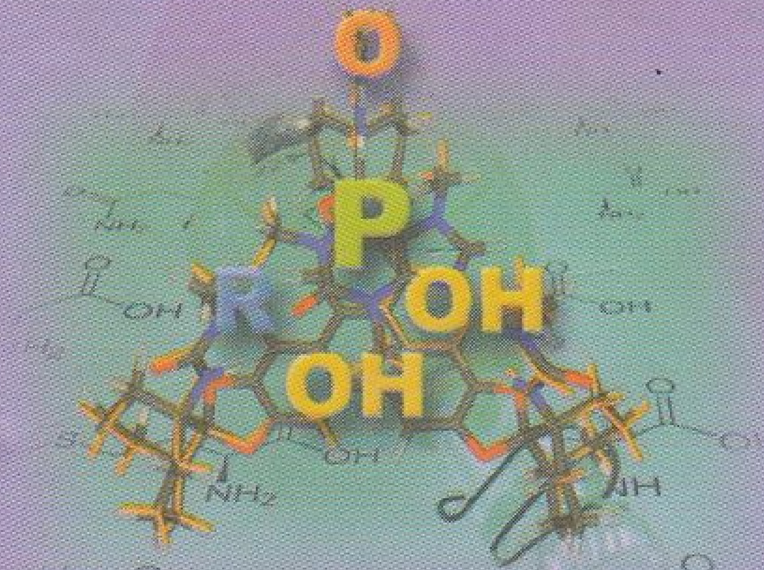
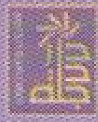
structure بنية، تركيب

Structural بنائي، تركيبي

Inv:1986

Date:15/2/2015

الكيمياء الحياتية التطبيقية



ISBN 9957-71-205-5
9789957712051



دار دجلة
ناشرون و موزعون
عمان - شارع الملك حسين - مجمع الفحيص
تلفاكس : ٠٠٩٦٢ ٦ ٤٦٤٧٥٥٠ خلوي :
ص ب : ٧١٢٧٧٣ عمان ١١١٧١ - الأردن
بغداد - شارع السعدون - عمارة فاطمة
تلفاكس : ٠٠٩٦٤ ١ ٨١٧٠٧٩٢ خلوي :
dardjlah@yahoo.com
www.dardjlah.com

